

ISABELLE PLANTE

**ÉTUDE ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DE TROIS POLYMORPHISMES (R87Q,
A251T ET P307S) IDENTIFIÉS DANS LE CANAL POTASSIQUE HKV1.5 CHEZ
L'HUMAIN ET ÉVALUATION DE LEUR RÔLE POTENTIEL DANS LA
FIBRILLATION AURICULAIRE POST-OPÉRATOIRE**

Thèse présentée

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en pharmacie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2006

Domingos Sabino a dit :

«Tout finit toujours bien.

Si les choses ne marchent pas convenablement,
c'est que vous n'êtes pas encore arrivé à la fin.»

Résumé court

La fibrillation auriculaire est une complication fréquente suite à un pontage coronarien. Elle est attribuable en particulier à un raccourcissement de la phase de plateau du potentiel d'action de l'oreillette. Le courant I_{Kur} , produit par le canal potassique hKv1.5, est grandement impliqué dans la repolarisation auriculaire. Afin de déterminer si des mutations ou des polymorphismes dans ce canal pourraient être impliqués dans le développement de la fibrillation auriculaire, nous avons séquencé le gène *hKv1.5* d'une population de Canadiens-Français. Trois polymorphismes (R87Q, A251T et P307S) ont été retrouvés à l'état hétérozygote dans la séquence peptidique et analysés au niveau électrophysiologique par la technique de patch-clamp. Alors que A251T ne modifie pas les fonctions du canal, R87Q et P307S produisent des changements qui pourraient accélérer la repolarisation auriculaire et potentiellement causer la fibrillation auriculaire. Par ailleurs, l'analyse de *hKv1.5* chez un groupe de patients ayant eu un pontage coronarien a montré que R87Q et P307S étaient retrouvés plus fréquemment chez les patients ayant fait de la fibrillation auriculaire post-opératoire, bien qu'aucun de ces polymorphismes n'ait pu être relié de façon significative à cette pathologie. Nos résultats suggèrent que des polymorphismes dans le canal hKv1.5 pourraient être impliqués dans la pathogenèse de la fibrillation auriculaire.

Résumé long

La fibrillation auriculaire peut, entre autre, apparaître suite à une chirurgie cardiaque telle un pontage coronarien ou encore être de type familial. Il est connu depuis longtemps que cette maladie est multigénique, mais ses bases génétiques sont encore mal comprises. La fibrillation auriculaire est caractérisée par une activité électrique anarchique et à haute fréquence entraînant un remodelage de l'oreillette. L'étude présentée dans cette thèse avait pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de cette pathologie. Étant donné que le canal potassique hKv1.5 (codé par le gène *hKv1.5*) produit un courant principal de la repolarisation de l'oreillette humaine (I_{Kur}), nous avons amplifié et séquencé le gène *hKv1.5* de 96 Canadiens-Français afin de déterminer si des mutations ou polymorphismes dans ce gène pourraient être à l'origine de la fibrillation auriculaire. Nous avons retrouvé, au niveau de la séquence peptidique, les polymorphismes R87Q, A251T et P307S à l'état hétérozygote chez certains patients. Ces derniers sont situés respectivement dans l'extrémité NH₂-terminale, le segment transmembranaire S1 et la première boucle extra-cellulaire du canal. Les polymorphismes ont été reproduits par mutagenèse dirigée, exprimés dans une lignée de cellules CHO et caractérisés sur le plan électrophysiologique par la technique de patch-clamp. Le polymorphisme A251T n'entrave pas les fonctions du canal hKv1.5, mais R87Q et P307S diminuent la densité du courant et l'amplitude de l'inactivation. R87Q accélère également la vitesse d'ouverture du canal. La co-expression de ces polymorphismes avec le canal sauvage, qui a été effectuée dans le but de reproduire leur caractère hétérozygote, a démontré que R87Q a un effet plutôt dominant contrairement à P307S. Afin de déterminer si les polymorphismes identifiés interfèrent avec la liaison du canal aux sous-unités β , chacun d'eux a été exprimé dans des cellules HEK293; ces dernières n'expriment pas de sous-unité β , contrairement aux cellules CHO qui expriment Kv β 2.1. Les caractéristiques électrophysiologiques observées dans les cellules CHO pour R87Q et P307S n'ont pas été reproduites dans les cellules HEK293, suggérant que ces polymorphismes modulent la liaison à la sous-unité β et que les effets observés dans les cellules CHO pourraient également s'exprimer dans le myocarde. Comme les polymorphismes R87Q et P307S tendent à augmenter la vitesse de la repolarisation de l'oreillette, nous avons tenté de savoir

s'ils pourraient être impliqués dans le développement de la fibrillation auriculaire. Nous avons recherché leur présence parmi une population de 135 patients ayant eu un pontage coronarien et desquels 46 ont fait de la fibrillation auriculaire post-opératoire. Bien qu'aucun d'eux n'ait pu être relié de façon significative à cette pathologie, nous avons observé une plus forte prévalence des polymorphismes R87Q et P307S chez les patients qui ont fait de la fibrillation auriculaire post-opératoire (fréquences alléliques respectives de 1,09 et 3,26% comparativement à 0 et 0,56% chez les patients demeurés en rythme sinusal). La présence des trois polymorphismes que nous avons identifiés et caractérisés lors de la présente étude a aussi été recherchée chez des patients atteints de fibrillation auriculaire familiale parmi quatre familles Canadiennes-Françaises. Cependant, seul A251T a été retrouvé chez une mère de famille présentant de la fibrillation auriculaire et chez sa fille non atteinte. Comme ce polymorphisme ne modifie pas les propriétés électrophysiologiques de hKv1.5, nos résultats démontrent que, du moins pour les quatre familles étudiées, des gènes autres que *hKv1.5* seraient en cause dans le développement de la maladie, qui est d'ailleurs multigénique. Compte tenu de leurs effets sur les fonctions du canal hKv1.5, nos travaux démontrent que les polymorphismes R87Q et P307S pourraient être impliqués, en combinaison avec d'autres facteurs tel le stress oxydatif causé par un pontage coronarien, dans le développement de la fibrillation auriculaire.

Avant-propos

Le corps de cette thèse est constitué de deux articles scientifiques. Le chapitre deux porte sur l'article intitulé «Electrophysiological characterization of three non-synonymous single nucleotide polymorphisms (R87Q, A251T and P307S) found in hKv1.5», par Isabelle Plante, Dominique Fournier, Guylaine Ricard, Benoît Drolet, Gilles O'Hara, Jean Champagne, Patrick Mathieu, Richard Baillot et Pascal Daleau. Cet article est publié dans *Pflugers Archivs*. J'ai effectué l'ensemble du travail décrit dans cette publication, soit le recrutement des patients, l'amplification et l'analyse de séquence du gène *hKv1.5*, la reproduction des polymorphismes identifiés par mutagenèse dirigée et les études électrophysiologiques sur les canaux variants. J'ai produit environ 60% de la rédaction. Le chapitre trois (première partie) est composé de l'article intitulé «Molecular analysis of hKv1.5 in patients with persistent post-surgery atrial fibrillation», par Isabelle Plante, Dominique Fournier, Patrick Mathieu et Pascal Daleau, soumis au *Canadian Journal of Cardiology*. Mon rôle, dans cette publication, consistait à amplifier et séquencer le gène *hKv1.5* de patients ayant subi un pontage coronarien, parmi lesquels certains ont fait de la fibrillation auriculaire post-opératoire. L'objectif de cette étude consistait à déterminer si la présence de polymorphismes dans *hKv1.5* pourrait augmenter l'incidence de la fibrillation auriculaire post-opératoire de façon significative. J'ai effectué environ 85% du travail présenté dans ce manuscrit, duquel j'ai rédié la majeure partie (80%). La deuxième partie du chapitre trois porte sur une étude effectuée dans le but d'évaluer le rôle potentiel des polymorphismes R87Q, A251T et P307S du canal potassique hKv1.5 dans l'incidence de la fibrillation auriculaire familiale. Enfin, un troisième article est présenté en annexe : «Reduced vulnerability to vagally-induced atrial fibrillation by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs», de Jean-Francois Sarrazin, Geneviève Comeau, Pascal Daleau, John Kingma, Isabelle Plante, Dominique Fournier et Franck Molin. Il a été soumis au *Journal of American College of Cardiology*. Il s'agit ici d'une collaboration avec d'autres équipes de recherche. Mon rôle, dans cette étude, consistait à enregistrer, par la technique de patch-clamp, les courants produits dans les myocytes cardiaques de chiens. Le but était de déterminer si l'administration d'acides gras oméga-3 modifiait l'activité électrique

cardiaque chez le chien. Les études électrophysiologiques que j'ai effectuées équivalent à environ 10% du travail total. Je n'ai pas participé à la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr Pascal Daleau, pour tout ce qu'il a fait pour moi au cours des quatre dernières années, notamment pour son aide dans les demandes de bourses et la préparation de présentations orales et écrites. Excellent pédagogue et très bon vulgarisateur, il a su me guider vers une plus grande autonomie en recherche et il m'a permis de développer davantage mon esprit critique. Malgré ses nombreuses tâches administratives, il est présent à 110% dans tout ce qu'il fait et c'est tout à son honneur. Son sens de l'humour, sa joie de vivre et sa bonne humeur m'ont par ailleurs été très agréables. Sincères remerciements, Pascal, j'ai passé de très belles années dans ton équipe de recherche.

J'aimerais ensuite remercier le Dr Laimonis Gailis pour ses conseils et son analyse critique lors de la rédaction d'articles et la préparation de présentations orales et écrites.

Mes remerciements vont également aux co-auteurs de mes publications et à tous ceux qui ont participé à mes travaux de recherche, soient : Dominique Fournier, Guylaine Ricard, Benoît Drolet, Gilles O'Hara, Jean Champagne, Patrick Mathieu, Richard Baillet, Pascal Daleau, Jean-Francois Sarrazin, Geneviève Comeau, John Kingma et Franck Molin.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance envers Marc-André Rodrigue et Jean Renaud de l'université Laval pour le séquençage automatique, Serge Simard pour les tests statistiques ainsi que Lynn Atton pour l'aide technique.

Merci à tous ceux qui ont travaillé au sein de l'équipe du Dr Daleau, depuis mon arrivée en janvier 2002, et que j'ai eu le plaisir de côtoyer : Dominique Fournier, Christiane Dongmo, Louis-Jean Bordeleau, Olivier Drouin, Geneviève Comeau, Joanie Baillargeon et Dany Patoine.

Ensuite, en ce qui a trait au financement de mes recherches, je tiens à remercier chaleureusement la Faculté de pharmacie de l'université Laval par l'entremise du Fonds d'Enseignement et de Recherche ainsi que du plan de soutien financier au doctorat, les Instituts de Recherche en Santé du Canada, la Fondation pour la Recherche en Santé ainsi que la Direction de la Recherche de l'Hôpital Laval.

Merci également à Rahima Ziane, Fatima-Zahra Barrane, Ernest Herbert, Julie Bérubé, Louise Courtemanche et Doris Cantin pour leur précieuse amitié. Je veux aussi remercier notre bonne, drôle et généreuse secrétaire Louise Pike et sa complice, Francine Gauvin. Par ailleurs, un gros merci à mes collègues et amis de l'Hôpital Laval : Dominique, André et Dany pour nos nombreuses parties de plaisir dans le laboratoire ainsi que nos discussions parfois cocasses... Notre complicité me fait du bien.

Merci à mes parents, mon frère et ma sœur pour leur intérêt. Au moment précis où j'écris ces lignes, je sens monter en moi une immense reconnaissance envers ma mère, qui a risqué sa vie pour me permettre de voir le jour et qui a su encourager mon goût du savoir dès mon plus jeune âge. La vie est parfois difficile, mais comme elle est agréable lorsqu'on sait sous quel angle la regarder!

Finalement, merci à Lyne Samson pour m'avoir soutenue et accompagnée au cours des quatre dernières années. Empreinte de perspicacité, elle a su me guider dans l'apprentissage de moi-même. Le chemin que j'ai parcouru en sa compagnie a été chargé d'émotions oh! combien libératrices!

Table des matières

RÉSUMÉ COURT	III
RÉSUMÉ LONG	IV
AVANT-PROPOS	VI
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVI
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	2
1. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU COEUR	2
1.1 PROPRIÉTÉS ÉLECTRIQUES DES CELLULES CARDIAQUES.....	2
1.2 PROPAGATION DE L'ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE CARDIAQUE	3
1.3 POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE	4
1.3.1 <i>Vitesse de conduction du potentiel d'action</i>	6
1.3.2 <i>Périodes réfractaires et supranormale</i>	8
1.4 ÉLECTROCARDIOGRAMME DE SURFACE	10
1.4.1 <i>Onde P</i>	11
1.4.2 <i>Complexe QRS</i>	11
1.4.3 <i>Onde T</i>	12
1.4.4 <i>Autres ondes</i>	12
1.4.5 <i>Intervalles importants sur l'ECG</i>	13
1.5 CANAUX IONIQUES.....	14
1.5.1 <i>Fonctionnement général des canaux ioniques</i>	16
1.5.2 <i>Principaux types de canaux ioniques exprimés dans le cœur</i>	17
1.6 POMPES ET ECHANGEURS	18
1.6.1 <i>Pompe Na⁺-K⁺-ATPase</i>	18
1.6.2 <i>Échangeur Na⁺/Ca²⁺</i>	19
1.6.3 <i>Échangeur Na⁺/H⁺</i>	20
1.7 CORRESPONDANCE ENTRE LES PHASES DU POTENTIEL D'ACTION ET L'ACTIVITÉ DES CANAUX IONIQUES	21
1.7.1 <i>Phase 0</i>	22
1.7.2 <i>Phase 1</i>	22
1.7.3 <i>Phase 2</i>	23
1.7.4 <i>Phase 3</i>	24
1.7.5 <i>Phase 4</i>	25
2. CANAL POTASSIQUE HKV1.5	27
2.1 SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE ET LOCALISATION DANS LE GÉNOME HUMAIN	29
2.2 STRUCTURE DU CANAL HKV1.5	29

2.2.1	<i>Formes pleine longueur et tronquée de hKv1.5</i>	33
2.3	PROPRIÉTÉS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES DE hKv1.5.....	34
2.3.1	<i>Activation</i>	38
2.3.2	<i>Inactivation</i>	39
2.3.3	<i>Désactivation et réactivation</i>	42
2.4	MÉCANISMES DE MODULATION DE hKv1.5.....	43
2.4.1	<i>Modulation par les kinases</i>	43
2.4.2	<i>Modulation par le pH</i>	45
2.4.3	<i>Modulation par les ions</i>	47
2.4.4	<i>Modulation par les espèces réactives de l'oxygène</i>	49
2.4.5	<i>Modulation par les androgènes</i>	50
2.4.6	<i>Modulation de l'expression de surface</i>	51
2.5	MODULATION PHARMACOLOGIQUE DU CANAL hKv1.5.....	54
2.5.1	<i>Anti-arythmiques de classe I</i>	54
2.5.2	<i>Anti-arythmiques de classe III</i>	54
2.5.3	<i>Antiarythmiques de classe IV</i>	55
2.5.4	<i>Molécules dirigées plus spécifiquement contre hKv1.5</i>	55
2.5.5	<i>Autres agents pharmacologiques modulant le canal hKv1.5</i>	57
2.6	LES "CHANNELOPATHIES".....	58
3.	FIBRILLATION AURICULAIRE	70
3.1	CIRCUITS DE REENTREES.....	70
3.2	REMODELAGE ELECTRIQUE DES OREILLETES.....	75
3.3	REMODELAGE STRUCTURAL DES OREILLETES.....	78
3.4	REMODELAGE ULTRA-STRUCTURAL DES OREILLETES.....	79
3.5	FA ET RISQUE DE THROMBOSES ET D'EMBOLIES.....	80
3.6	FORMES DE FIBRILLATION AURICULAIRE.....	81
3.6.1	<i>Fibrillation auriculaire associée à d'autres maladies</i>	82
3.6.2	<i>Fibrillation auriculaire post-opératoire</i>	84
3.6.3	<i>Fibrillation auriculaire idiopathique et familiale</i>	87
3.7	TRAITEMENT DE LA FIBRILLATION AURICULAIRE.....	88
3.7.1	<i>Contrôle de la cadence ventriculaire</i>	89
3.7.2	<i>Restauration et maintien du rythme sinusal</i>	89
3.7.3	<i>Traitement chirurgical</i>	91
3.8	POLYMORPHISMES POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA FA.....	92
3.9	PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	95
CHAPITRE 2	138
ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THREE NON-SYNONYMOUS SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (R87Q, A251T AND P307S) FOUND IN HKV1.5	139
RÉSUMÉ	140
ABSTRACT	141
INTRODUCTION	142

METHODS	143
RESULTS	145
DISCUSSION	149
ACKNOWLEDGEMENTS	152
TABLES	153
REFERENCES	155
FIGURE LEGENDS	158
FIGURES	160
CHAPITRE 3 : PREMIÈRE PARTIE	167
MOLECULAR ANALYSIS OF HKV1.5 IN PATIENTS WITH PERSISTENT POST-SURGERY ATRIAL FIBRILLATION	168
SUMMARY:	169
ABSTRACT	170
RÉSUMÉ	171
INTRODUCTION	172
METHODS	173
RESULTS	174
DISCUSSION	176
ACKNOWLEDGEMENTS	178
REFERENCES	179
FIGURE LEGEND	182
TABLES	183
FIGURE	184
CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PARTIE	185
RÔLE POTENTIEL DES POLYMORPHISMES R87Q, A251T ET P307S DANS L'INCIDENCE DE LA FA FAMILIALE	186
BIBLIOGRAPHIE:	190
CHAPITRE 4	191
CONCLUSION GÉNÉRALE	192
IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE POLYMORPHISMES DANS LE CANAL hKv1.5 ..	193
LIEN ENTRE LES POLYMORPHISMES IDENTIFIÉS DANS LE CANAL hKv1.5 ET L'INCIDENCE DE LA FA POST-OPÉRATOIRE	200
LIEN ENTRE LES POLYMORPHISMES IDENTIFIÉS DANS LE CANAL hKv1.5 ET L'INCIDENCE DE LA FA FAMILIALE	203

CONCLUSION ET PERSPECTIVES D'AVENIR RELIÉES AUX RÉSULTATS DE CETTE THÈSE	204
AUTRES AVENUES POUR L'ÉTUDE DE LA GENÈSE DE LA FA	208
BIBLIOGRAPHIE:.....	210
ANNEXE.....	217
REDUCED VULNERABILITY TO VAGALLY-INDUCED ATRIAL FIBRILLATION BY N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN DOGS.....	218
RÉSUMÉ	219
ABSTRACT.....	220
CONDENSED ABSTRACT.....	221
LIST OF ABBREVIATIONS	222
INTRODUCTION	223
METHODS.....	224
RESULTS	227
DISCUSSION.....	229
ACKNOWLEDGMENTS.....	232
REFERENCES.....	233
FIGURE LEGENDS.....	238
TABLES.....	239
FIGURES.....	240
MESURE DES COURANTS IONIQUES PAR LA TECHNIQUE DE PATCH- CLAMP.....	247

Liste des tableaux

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	PAGE
TABLEAU I: Vitesses de conduction du potentiel d'action dans les différentes régions du cœur.....	7
TABLEAU II: Concentration des principaux ions à l'intérieur et à l'extérieur des myocytes cardiaques. La direction dominante du flux passif propre à chacun de ces ions est également indiquée, ainsi que le type de courant généré et l'effet sur la membrane plasmique.....	15
TABLEAU III: Liste des principales channelopathies cardiaques montrant la cause de chacune d'elles ainsi que les gènes défectueux qui y sont associés et leur position sur le chromosome.....	59

Liste des figures

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	PAGE
FIGURE 1: Illustration des phases du potentiel d'action dans les cellules des fibres de Purkinje (A) et les cellules du nœud sinusal (B).....	6
FIGURE 2: Représentation d'un potentiel d'action normal de fibre de Purkinje et illustration des différentes périodes réfractaires, de la période supranormale d'excitabilité et du temps de réversibilité totale.....	10
FIGURE 3: Schéma du cœur humain illustrant l'allure des potentiels d'action spécifiques aux différentes régions du cœur impliquées dans la propagation de l'activité électrique. Tel qu'illustré, les potentiels d'action sont reportés sur l'électrocardiogramme de surface.....	11
FIGURE 4: Distribution des principaux courants ioniques à chacune des phases du potentiel d'action dans les ventricules (gauche) et les oreillettes (droite).....	26
FIGURE 5: Arbres phylogénétiques des canaux K_v	28
FIGURE 6: Structure des protéines transmembranaires formant les sous-unités α et β qui, en s'associant l'une à l'autre, produisent le courant potassique I_{Kur}	31
FIGURE 7: Modèle de la sous-unité α du canal potassique KvAP d' <i>Aeropyrum pernix</i>	32
FIGURE 8: A. Modèle conventionnel d'activation des canaux dépendants du voltage, selon lequel le senseur de voltage, chargé positivement, sort vers l'extérieur et se retourne en faisant ouvrir le pore, sans aucun autre changement de conformation du canal. B. Le nouveau modèle propose que les senseurs de voltage se réorientent de près de 90° et poussent sur la membrane plasmique de façon à faire ouvrir le pore du canal lors de l'activation.....	33
FIGURE 9: Structure bi-dimensionnelle d'un canal hKv1.5 intact (FL hKv1.5, pleine longueur) et tronqué (hKv1.5 Δ N209).....	34
FIGURE 10: Illustration des différents états de conduction présumés du canal potassique hKv1.5, selon un principe imagé de portes d'activation (A) et d'inactivation (I) qui s'ouvrent et se ferment en fonction du potentiel transmembranaire.....	36

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	PAGE
FIGURE 11: Schéma de hKv1.5 illustrant les régions importantes du canal (segments transmembranaires S1 à S6, pore, tourelle, filtre sélectif) ainsi que des résidus grandement impliqués dans l'activation et l'inactivation. La position de certains polymorphismes identifiés dans hKv1.5 y est également indiquée.....	41
FIGURE 12: Exemples d'ECG illustrant les manifestations cliniques de certaines "channelopathies" cardiaques.....	61
FIGURE 13: Circuits de réentrées selon les théories du "leading circle" (gauche) et de l'onde spiralée (droite).....	72
FIGURE 14: Circuit de réentrée provoqué par un bloc de conduction unidirectionnel.....	74
FIGURE 15: Schéma représentant les mécanismes potentiellement impliqués dans le remodelage électrique de l'oreillette lors de la FA.....	77

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- AMPC** : Adénosine monophosphate cyclique
- ARE** : Androgen response element
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : ARN messenger
- A251T** : Changement d'une alanine pour une thréonine à la position 251 du canal potassique hKv1.5
- ATP** : Adénosine triphosphate
- AVC** : Accidents vasculaires cérébraux
- Cav** : Canaux calciques dépendants du voltage (Ex. : Cav1.2)
- C-ELISA** : Competitive enzyme-linked immuno-assay
- CETP** : Cholesteryl ester transfer protein
- CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, un canal chlore
- CIC-2 et CIC-3** : Canaux chlore impliqués dans la régulation du volume cellulaire
- CLCA** : Canaux chlore activés par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium
- COS1** : African green monkey fibroblast-like cell line (lignée cellulaire)
- CRP** : Protéine C réactive
- Cx40** : Connexine 40
- DHT** : Dihydrotestostérone
- DPA** : Durée du potentiel d'action
- ECG** : Électrocardiogramme de surface
- E_{ion}** : Potentiel d'équilibre ionique
- FA** : Fibrillation auriculaire
- g_{max}** : Conductance maximale relative
- HDL** : High density lipoprotein
- HEK293** : Human embryonic kidney 293 (lignée cellulaire)
- HERG** : Canal potassique responsable du courant I_{Kr}

- hKv1.5*** : Gène codant pour le canal potassique Kv1.5 de l'humain (hKv1.5)
- hKv1.5ΔN209*** : Forme du canal hKv1.5 dont l'extrémité NH₂-terminale est tronquée
- hKvβ1.2* et *hKvβ1.3*** : Sous-unités β retrouvées dans le cœur humain et qui modulent les propriétés électrophysiologiques du canal hKv1.5
- H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- HSP65** : Heat shock protein 65
- IC₅₀** : Concentration à laquelle on observe 50% d'inhibition
- I_{Ca,L}*** : Courant calcique de type L
- I_f*** : Courant pacemaker
- I_{KAch}*** : Courant potassique activé par l'acétylcholine
- I_{KATP}*** : Courant potassique dépendant de l'adénosine triphosphate
- I_{Kr}*** : Composante rapide du courant potassique rectifiant retardé
- I_{Ks}*** : Composante lente du courant potassique rectifiant retardé
- I_{K1}*** : Courant potassique repolarisateur impliqué dans le maintien du potentiel de repos
- I_{Na}*** : Courant sodique cardiaque
- I_p*** : Courant sortant produit par la pompe Na⁺-K⁺-ATPase
- I_{to}*** : Courant potassique transitoire sortant
- I_{to,f}*** : Composante rapide du courant potassique transitoire sortant
- I_{to,s}*** : Composante lente du courant potassique transitoire sortant
- I_{to2}*** : Courant chlore impliqué dans la phase 1 du potentiel d'action cardiaque
- KCHIP2** : Kv channel interacting protein 2
- Kv** : Canaux potassiques dépendants du voltage (Ex. : Kv1.5)
- Kv1.5** : Canal potassique dépendant du voltage de la famille 1, membre 5
- Kvβ2.1** : Sous-unité β retrouvée dans les cellules CHO et reconnue pour moduler les propriétés électrophysiologiques du canal hKv1.5
- LDL-cholestérol** : Low density lipoprotein cholestérol
- LQTS** : Syndrome du QT long
- Ltk*** : Mouse L cells lacking thymidine kinase (lignée cellulaire)
- LDL** : Low density lipoprotein
- Nav** : Canaux sodiques dépendants du voltage (Ex. : Nav1.5)
- NMG⁺** : Ion *N*-methyl-D-glucamine

- OH⁻** : Ion hydroxyle
- PDZ** : PSD95 (post synaptic density protein), DlgA (Drosophila disc large tumor suppressor), ZO1 (protéine jonctionnelle de mammifère)
- PKA** : Protéine kinase A
- PKC** : Protéine kinase C
- PRA** : Période réfractaire absolue
- PRE** : Période réfractaire efficace
- PRR** : Période réfractaire relative
- PRT** : Période réfractaire totale
- P307S** : Changement d'une proline pour une serine à la position 307 du canal potassique hKv1.5
- PSN** : Période supranormale
- QTc** : Intervalle QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque
- RPTP μ** : Receptor-type protein tyrosine phosphatase μ
- R87Q** : Changement d'une arginine pour une glutamine à la position 87 du canal potassique hKv1.5
- SACs** : Stretch activated channels
- SAP97** : Synapse-associated protein 97
- SH3** : Site consensus de liaison à la tyrosine kinase *src* (*src* homology 3)
- SQTS** : Syndrome du QT court
- T1** : Domaine de tétramérisation des canaux potassiques dépendants du voltage
- τ_{act} fast** : Constante de temps rapide d'activation
- τ_{inact} fast** : Constante de temps rapide d'inactivation
- τ_{act} slow** : Constante de temps lente d'activation
- τ_{inact} slow** : Constante de temps lente d'inactivation
- TRT** : Temps de réversibilité totale
- TVCP** : Tachycardie ventriculaire catécholaminergique polymorphe
- V_{max}** : Vitesse à laquelle s'effectue la dépolarisation
- V/sec** : Volts par seconde

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Structure et fonctionnement du coeur

De manière générale, on peut considérer que le cœur est constitué de deux principaux types de tissus. Le premier inclut les oreillettes et les ventricules, qui en forment l'essentiel de la masse et qui sont responsables du travail de contraction. Le deuxième type est une chaîne de tissus impliqués dans la formation et la propagation des influx électriques qui sont à l'origine des contractions cardiaques. Ces influx provoquent la dépolarisation et la repolarisation séquentielles des cellules musculaires du coeur, comme nous le verrons un peu plus loin.¹

1.1 Propriétés électriques des cellules cardiaques

Les cellules spécialisées dans la production et la propagation de l'activité électrique forment le système de conduction du cœur. Elles sont douées d'automatisme, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se dépolariser spontanément et, de ce fait, d'amorcer la contraction cardiaque. Leur fonction consiste à produire des influx électriques et à les propager dans le cœur afin que les cellules musculaires se dépolarisent et se contractent systématiquement des oreillettes aux ventricules. Par conséquent, le cœur bat comme s'il n'était formé que d'un seul élément: c'est un syncytium. Les influx électriques produits dans le cœur se nomment "potentiels d'action" et ils se propagent d'une cellule à l'autre notamment grâce à l'existence de jonctions gap et de canaux ioniques.¹ Les jonctions gap sont des canaux peu sélectifs qui relient les cytoplasmes de cellules adjacentes et permettent le passage d'ions et de petites molécules.² Pour ce qui est des canaux ioniques, ce sont des pores transmembranaires éventuellement spécifiques à certains ions. Ce sujet sera traité plus en détails à la prochaine section.

1.2 Propagation de l'activité électrique cardiaque

Les cellules du système de conduction sont situées dans les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire, le faisceau de His, les branches droite et gauche du faisceau de His et les fibres de Purkinje. Le potentiel d'action cardiaque est initié par le nœud sinusal, qui est le centre rythmogène principal, ou «pacemaker». Typiquement, le nœud sinusal se dépolarise spontanément environ 75 fois par minute chez l'homme. Comme cette fréquence de dépolarisation dépasse celle des autres éléments du système de conduction du cœur, le nœud sinusal marque la cadence de toutes les cellules contractiles cardiaques.

Du nœud sinusal, le potentiel d'action se propage d'abord dans l'oreillette droite par les cellules contractiles et il rejoint ensuite l'oreillette gauche et le nœud auriculo-ventriculaire. Cette propagation se fait rapidement en empruntant des voies de conduction complexes nommées communément "tractus internodaux". Ce sont des voies reliant les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire. Trois tractus internodaux sont connus. Premièrement, le tractus antérieur, a deux branches: l'une relie les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire et l'autre, appelée faisceau de Bachmann,³ traverse le septum interauriculaire et permet de transmettre les influx électriques de l'oreillette droite à l'oreillette gauche. Les deux autres voies de conduction sont les tractus internodaux médian et postérieur, nommés respectivement tractus de Wenckebach^{4, 5} et Thorel.^{6, 7}

Lorsqu'il atteint le nœud auriculo-ventriculaire, le potentiel d'action est retardé pendant environ 0,1 seconde, ce qui permet aux oreillettes d'achever leur contraction avant que les ventricules amorcent la leur. Ce retard est en grande partie lié au fait que les fibres cardiaques ont à cet endroit un nombre relativement restreint de jonctions gap, réduisant le couplage intercellulaire et la vitesse de conduction. Par la suite, le potentiel d'action parcourt rapidement le reste du système de conduction.

Du nœud auriculo-ventriculaire, le potentiel d'action rejoint le faisceau de His. Bien que les oreillettes et les ventricules soient adjacents, ils ne sont pas reliés physiquement et électriquement autrement que par le faisceau de His. Le potentiel d'action se propage ensuite dans les branches droite et gauche du faisceau de His, qui parcourent le septum interventriculaire. Finalement, les fibres de Purkinje achèvent la conduction rapide

du potentiel d'action à travers le septum interventriculaire et le conduisent ensuite dans l'apex du cœur, puis dans les parois des ventricules. Les branches du faisceau de His assurent l'excitation des cellules du septum, mais l'essentiel de la dépolarisation ventriculaire est attribuable aux fibres de Purkinje et, en dernier lieu, à la transmission du potentiel d'action d'une fibre musculaire à l'autre du muscle cardiaque.

Dans un cœur humain sain, il s'écoule environ 0,22 seconde entre la production du potentiel d'action par le nœud sinusal et la dépolarisation des dernières cellules musculaires des ventricules. La contraction des ventricules suit presque immédiatement l'onde de dépolarisation ventriculaire. Elle naît à l'apex du cœur et se propage vers la base, suivant la direction de l'onde d'excitation dans les ventricules.

Enfin, bien que l'on trouve des cellules du système de conduction dans presque toutes les parties du cœur, leurs fréquences de dépolarisation spontanée diffèrent. Par exemple, tandis que le nœud sinusal impose au cœur une fréquence approximative de 60 à 100 battements par minute, le nœud auriculo-ventriculaire se dépolarise de 40 à 55 fois par minute. Le faisceau de His et les fibres de Purkinje, pour leur part, se dépolarisent seulement entre 25 et 40 fois par minute.¹

1.3 Potentiel d'action cardiaque

Les myocytes cardiaques sont activés par un signal électrique, le potentiel d'action, au cours duquel ont lieu une série de changements dans leur potentiel transmembranaire. Comme toutes les cellules vivantes, l'intérieur des myocytes cardiaques est chargé négativement par rapport à l'extérieur, ce qui crée une différence de voltage à travers la membrane cellulaire. C'est cette différence de voltage qui est appelée le potentiel transmembranaire. Ce dernier est d'environ -90 mV lorsque les myocytes cardiaques sont au repos.⁸ Un changement de potentiel transmembranaire qui diminue l'électronégativité à l'intérieur du myocyte au repos est appelé "dépolarisation" alors que le retour au potentiel de repos se nomme "repolarisation". Les potentiels d'action cardiaques incluent au moins deux phases, soient la dépolarisation et la repolarisation.

Pour initier un potentiel d'action, la dépolarisation doit atteindre un seuil minimal de potentiel transmembranaire. Ce seuil est d'environ -75 mV. Les premiers enregistrements transmembranaires de l'activité électrique cardiaque ont été réalisés sur un cœur de chien en 1949, par Coraboeuf et Weidmann.^{8, 9} Depuis, le potentiel d'action cardiaque a été étudié sur de nombreux tissus d'espèces animales variées de même que sur le cœur humain. Chaque partie du cœur a son potentiel d'action spécifique, avec une durée et une allure bien définies. Globalement, le potentiel d'action des oreillettes, des ventricules, du faisceau de His et des fibres de Purkinje, par exemple, est constitué des phases de dépolarisation (phase 0), de repolarisation transitoire rapide (phase 1), de plateau (phase 2), de repolarisation (phase 3) et de repos (phase 4) (Figure 1A). Toutefois, la phase de plateau est plutôt brève dans l'oreillette alors qu'elle est très prononcée dans les fibres de Purkinje. La durée du potentiel d'action est par conséquent beaucoup plus longue dans ces dernières que dans l'oreillette. La diastole correspond à la dilatation du cœur, qui permet la circulation du sang dans les artères coronaires, et elle alterne avec la systole, qui réfère au mouvement de contraction.¹

Si on regarde les potentiels d'action des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire, par contre, on ne remarque pas les phases 1 et 2. En effet, les cellules de ces parties du cœur se dépolarisent beaucoup plus lentement et leurs potentiels d'action sont plus courts et n'ont pas de plateau (Figure 1B). Ils sont également de plus faible amplitude. Les cellules nodales génèrent des potentiels d'action de façon spontanée et le potentiel de repos de ces cellules est instable. On parle alors de dépolarisation diastolique automatique.

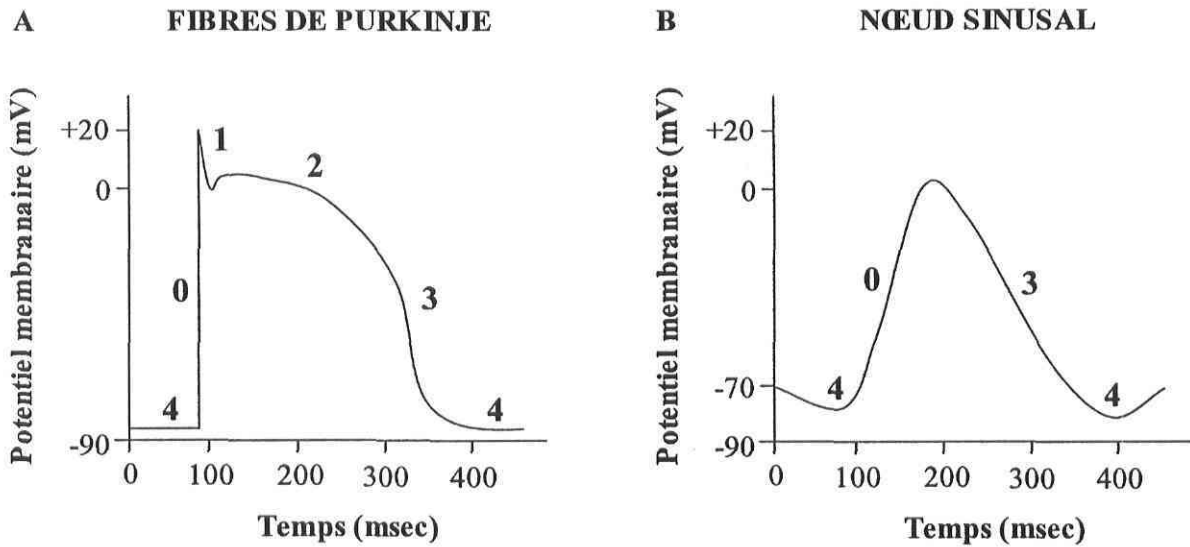


Figure 1 : Illustration des phases du potentiel d'action dans les cellules des fibres de Purkinje (A) et les cellules du nœud sinusal (B). Dans les fibres de Purkinje, tout comme dans les oreillettes, les ventricules et le faisceau de His, le potentiel d'action est constitué de cinq phases (0 à 4). Dans les cellules nodales, la dépolarisation est beaucoup plus lente et le potentiel d'action n'a pas de plateau, ce qui fait qu'il n'est constitué que des phases 0, 3 et 4.

1.3.1 Vitesse de conduction du potentiel d'action

Le potentiel d'action se propage dans les différentes régions du cœur à des vitesses de conduction propres à chacune d'elles, tel qu'indiqué au tableau I. Par exemple, il est propagé plus rapidement dans les branches du faisceau de His et les fibres de Purkinje et moins rapidement dans l'oreillette et le ventricule. Dans les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire, le potentiel d'action se propage très lentement.

Tableau I: Vitesses de conduction du potentiel d'action dans les différentes régions du cœur.¹

Région du cœur	Vitesse de conduction (m/sec)
Nœud sinusal	< 0,01
Oreillette	1,0-1,2
Nœud auriculo-ventriculaire	0,02-0,05
Faisceau de His	1,2-2,0
Branches du faisceau de His	2,0-4,0
Fibres de Purkinje	2,0-4,0
Ventricule	0,3-1,0

La vitesse de conduction du potentiel d'action est influencée par un certain nombre de facteurs inter-reliés qui ont été originalement définis par Hodgkin et Huxley en 1952, selon une étude faite sur l'axone géant de calmar.¹⁰ Ces facteurs incluent le seuil minimal de potentiel transmembranaire à atteindre pour initier le potentiel d'action (i.e. l'excitabilité membranaire), la vitesse à laquelle s'effectue la dépolarisation (V_{max}), l'amplitude du potentiel d'action et les résistances électriques du tissu cardiaque.

L'excitabilité membranaire réfère à la quantité de charges positives qui sont nécessaires à la dépolarisation d'une surface cellulaire minimale qui permet à l'activité électrique de se propager. Lorsque l'excitabilité membranaire est diminuée, la quantité de charges nécessaires à cette dépolarisation doit être plus importante, ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de conduction du potentiel d'action.

Ensuite, en général, plus la dépolarisation est rapide, plus l'amplitude du potentiel d'action est grande et plus la vitesse de conduction est élevée. En effet, les potentiels d'action de plus grande amplitude initient la dépolarisation plus rapidement et une dépolarisation plus rapide augmente la vitesse à laquelle l'onde de dépolarisation atteint les fibres cardiaques au repos. D'ailleurs, l'amplitude et la V_{max} dans les fibres de Purkinje, qui ont une vitesse de conduction rapide, sont respectivement d'environ 130-140 mV et 500-1000 V/sec, comparativement à 60-80 mV et <10 V/sec dans les nœuds sinusal et

auriculo-ventriculaire.¹¹ Le potentiel d'action se propage très lentement dans ces derniers, tel qu'indiqué au tableau 1. Cependant, la vitesse de propagation dépend aussi de l'architecture des tissus cardiaques et de la distribution des jonctions gap.¹² Ainsi, dans certaines régions du cœur (par exemple dans une zone de nécrose), la dépolarisation peut s'effectuer rapidement (V_{\max} élevée) bien que la vitesse de propagation soit ralentie par un nombre plus restreint de jonctions gap ouvertes.

Enfin, pour ce qui est des résistances électriques, elles sont attribuables à la structure des cellules et des fibres cardiaques. Ces dernières ont globalement les propriétés électriques caractéristiques d'un câble linéaire, coaxial.¹³ De fait, les cellules cardiaques individuelles sont reliées électriquement entre elles par des jonctions gap,¹⁴ qui facilitent la propagation du potentiel d'action de cellule à cellule et, ainsi, la constitution de longs "câbles" fonctionnels. Les éléments électriques de ces "câbles" comprennent la résistance et la capacité membranaires et la résistance interne longitudinale (somme des résistances du cytoplasme et des jonctions gap ouvertes).^{13, 15} Ainsi, plus il y a de jonctions gap ouvertes dans une région du cœur (résistance longitudinale diminuée), plus la vitesse de conduction du potentiel d'action est élevée.¹

1.3.2 Périodes réfractaires et supranormale

Lorsque le potentiel d'action achève sa propagation, il y a une période réfractaire pendant laquelle la fibre musculaire cardiaque est inexcitable.¹⁶ Il existe plusieurs types de périodes réfractaires, soient: absolue, efficace, relative et totale, tel qu'indiqué à la figure 2. Débutant avec la dépolarisation, la période réfractaire absolue (PRA) est celle pendant laquelle aucun stimulus, peu importe son amplitude, ne peut générer un potentiel d'action. La période réfractaire efficace (PRE), pour sa part, inclut la PRA ainsi qu'un petit intervalle de temps où les stimulations produisent des réponses locales (Figure 2, a et b), c'est-à-dire qu'elles sont de si faible amplitude qu'elles ne peuvent pas se propager. La réponse propagée la plus précoce (Figure 2, c) définit la fin de la PRE. Les réponses a, b et c ont lieu, en fait, lors de la période réfractaire relative (PRR), durant laquelle seuls les stimuli surpassant le potentiel membranaire seuil normal peuvent initier une réponse propagée.

Cependant, les potentiels d'action générés lors de la PRR ont une phase de dépolarisation lente et sont de faible amplitude. L'ensemble des périodes réfractaires absolue et relative constitue la période réfractaire totale (PRT).¹¹

Une période supranormale (PSN) est parfois rencontrée à la fin de la PRR, au cours de laquelle le seuil de potentiel membranaire à atteindre pour produire un potentiel d'action est réduit par rapport à la normale.^{17, 18} Une étude réalisée sur l'axone géant de calmar a démontré que ce seuil était diminué d'environ 20% lors de la PSN.¹⁹ Les potentiels d'action générés pendant cette période sont cependant de plus faible amplitude, tel qu'illustré en "d" sur la figure 2.¹¹ La PSN a été bien documentée dans le faisceau de His et les fibres de Purkinje, mais serait probablement absente dans le nœud auriculo-ventriculaire, les oreillettes et les ventricules.²⁰ Après la PSN, lorsque la repolarisation est complète, les potentiels d'action reprennent une amplitude normale (Figure 2, e). L'intervalle de temps entre la dépolarisation et la fin de la PSN réfère au temps de réversibilité totale (TRT).¹¹

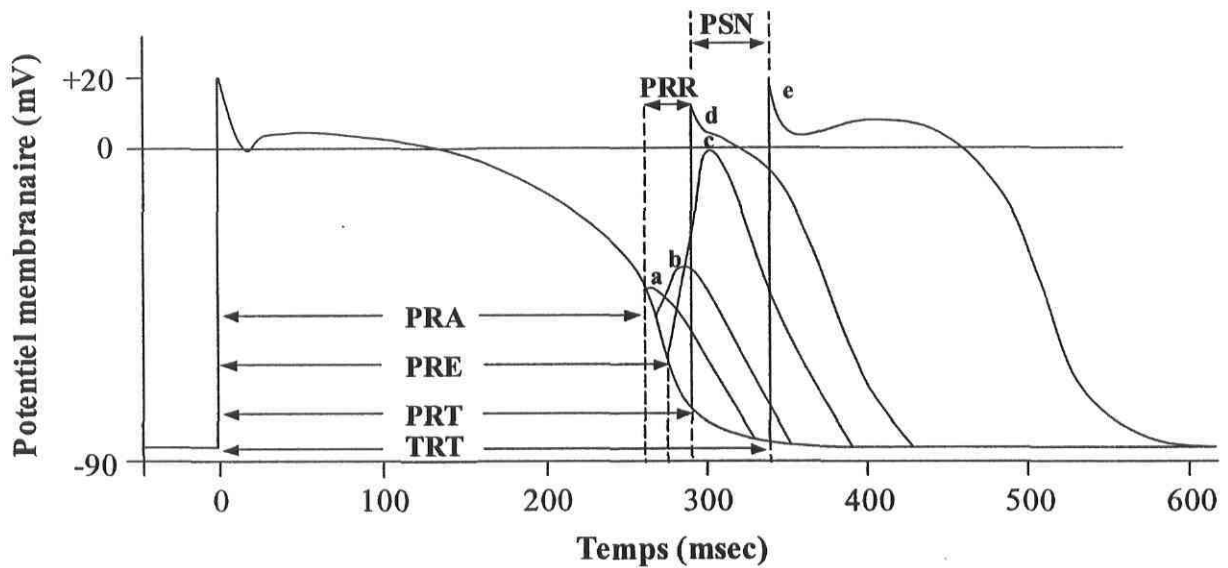


Figure 2. Représentation d'un potentiel d'action normal de fibre de Purkinje et illustration des différentes périodes réfractaires, de la période supranormale d'excitabilité et du temps de réversibilité totale. Les réponses à des stimulations précoces à différents temps choisis lors de la repolarisation sont également montrées (a à e). PRA: période réfractaire absolue; PRE: période réfractaire efficace; PRR: période réfractaire relative; PRT : période réfractaire totale; PSN: période supranormale d'excitabilité; TRT: temps de réversibilité totale.

1.4 Électrocardiogramme de surface

L'activité électrique du cœur est facilement détectée grâce à l'électrocardiogramme de surface (ECG), qui est composé principalement de cinq ondes appelées P, Q, R, S et T, tel qu'illustré à la figure 3. Il est utile pour détecter certains désordres cardiaques comme les arythmies. Bien que l'ECG n'enregistre pas directement l'activité électrique du cœur, chaque onde reflète un changement du champ électrique à la surface du corps, qui est généré principalement par l'activité électrique cardiaque.

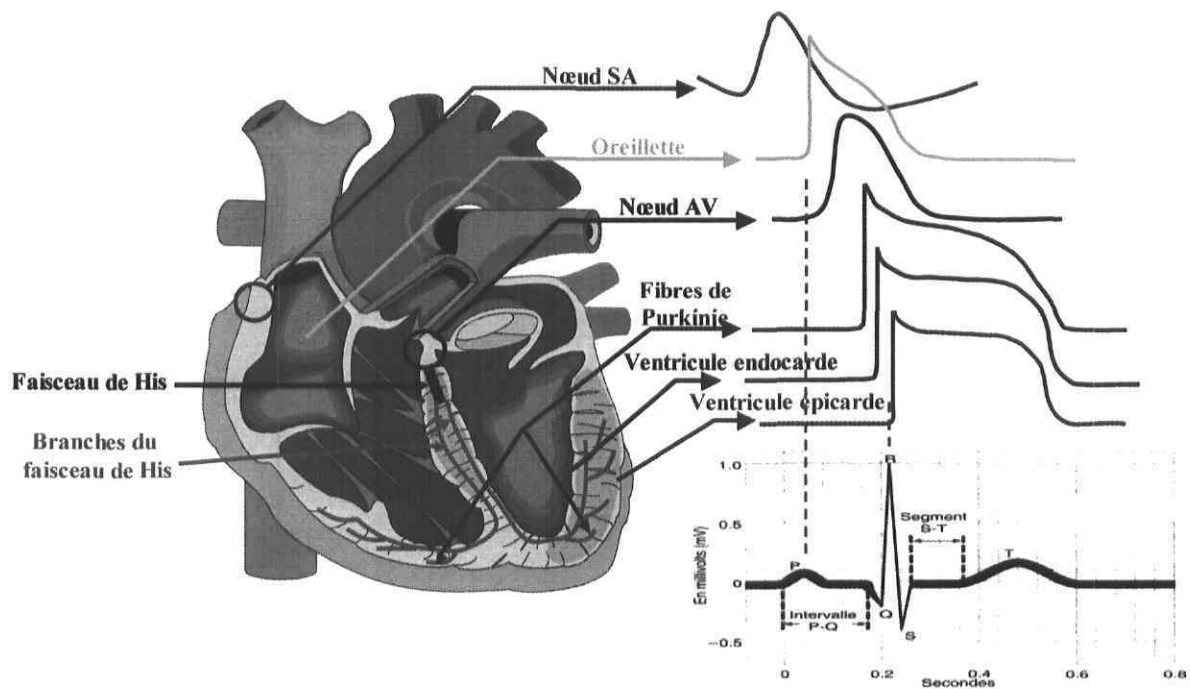


Figure 3: Schéma du cœur humain illustrant l'allure des potentiels d'action spécifiques aux différentes régions du cœur impliquées dans la propagation de l'activité électrique. Tel qu'illustré, les potentiels d'action sont reportés sur l'électrocardiogramme de surface.

1.4.1 Onde P

L'onde P est de faible amplitude et dure environ 0,08 seconde. Elle résulte de la dépolarisation des oreillettes, engendrée par le nœud sinusal. Environ 0,1 seconde après le début de l'onde P, les oreillettes se contractent.

1.4.2 Complexe QRS

Le complexe QRS est lié à la dépolarisation asynchrone de l'endocarde et de l'épicarde des ventricules. L'amplitude du complexe QRS est plus grande que celle de l'onde P étant donné que la taille des ventricules est supérieure à celle des oreillettes. La

durée du complexe QRS représente le temps pris par l'onde de dépolarisation pour passer à travers le faisceau de His, les fibres de Purkinje et les ventricules. Celle-ci reflète l'activation synchronisée et rapide des deux ventricules, grâce à la vitesse rapide de conduction du potentiel d'action dans le faisceau de His et les fibres de Purkinje. Le complexe QRS coïncide globalement avec la phase 0 du potentiel d'action des ventricules.

1.4.3 Onde T

L'onde T est causée par la repolarisation asynchrone de l'endocarde et de l'épicarde des ventricules; elle dure généralement 0,16 seconde. Elle réfère à la phase 3 du potentiel d'action ventriculaire. L'onde T est plus étendue et de moins grande amplitude que le complexe QRS parce que la repolarisation ventriculaire est plus lente que la dépolarisation. De plus, le complexe QRS et l'onde T ont tous deux une polarité positive sur l'ECG, selon la position conventionnelle des électrodes à la surface du corps. La direction de l'onde T est largement déterminée par les longs potentiels d'action des fibres de Purkinje et des myocytes de l'endocarde, qui font en sorte que les premières régions des ventricules à être dépolarisées sont repolarisées en dernier. En effet, la repolarisation des ventricules procède normalement dans une direction opposée à celle de leur dépolarisation. C'est pour cette raison que l'on parle de dépolarisation et de repolarisation relativement asynchrones au travers de la paroi du myocarde. Pour ce qui est de la repolarisation auriculaire, étant donné qu'elle a lieu pendant la période de dépolarisation des ventricules, son déroulement est masqué par l'activité ventriculaire.

1.4.4 Autres ondes

Outre l'onde T, deux autres ondes peuvent apparaître sur l'ECG conséquemment à la repolarisation ventriculaire. Il s'agit des ondes J et U. L'onde J, aussi appelée onde de Osborn,²¹ est une déflexion en forme de dôme apparaissant immédiatement après le complexe QRS. Cette onde a été communément observée chez le chien en conditions

physiologiques, mais chez l'humain, elle est normalement cachée partiellement ou complètement par le complexe QRS.²² Une onde J proéminente est souvent associée à des conditions d'hypothermie et d'hypercalcémie.^{23, 24} Des études ont aussi associé l'onde J à une variété de facteurs, incluant l'hypoxie, l'acidose, un retard dans la dépolarisation ventriculaire ou une repolarisation ventriculaire précoce.²⁵

Pour ce qui est de l'onde U, elle suit l'onde T et fait généralement moins du quart de son amplitude. Bien qu'elle puisse être présente sur l'ECG d'un adulte dont le cœur est normal, elle est surtout rencontrée chez des patients atteints du syndrome du long QT congénital.²² Elle est aussi communément retrouvée chez les athlètes de haut niveau.^{26, 27} L'onde U serait possiblement attribuable à un retard de repolarisation des fibres de Purkinje.²²

1.4.5 Intervalles importants sur l'ECG

Il y a trois intervalles importants sur l'ECG: PR, QT et ST. L'intervalle PR représente le temps pris par l'onde de dépolarisation pour se transmettre du nœud sinusal aux ventricules, en passant par les oreillettes, le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje. L'intervalle PR dure environ 0,16 seconde. C'est l'intervalle de temps entre l'activation des oreillettes et des ventricules, qui correspond au remplissage des ventricules.

Pour ce qui est de l'intervalle QT, il est situé entre le début du complexe QRS et la fin de l'onde T. Il correspond au temps nécessaire (environ 0,36 seconde) entre la dépolarisation et la repolarisation des ventricules. L'intervalle QT couvre donc approximativement le temps requis pour la contraction ventriculaire. Enfin, l'intervalle ST, pour sa part, est d'une durée d'approximativement 0,28 seconde; il s'étend de la fin du complexe QRS jusqu'à l'onde T. Il représente le temps pendant lequel les cellules ventriculaires sont toutes à leur phase de plateau (faibles gradients électriques dans les ventricules).

1.5 Canaux ioniques

Tel que mentionné dans la section 1.3, chaque partie du cœur a son potentiel d'action spécifique. Le profil des potentiels d'action cardiaques est attribuable à l'ouverture et à la fermeture séquentielles de différents types de canaux ioniques. Ceux-ci sont des protéines formant des pores à travers la membrane plasmique des organelles et des cellules, permettant le passage d'ions. Ces derniers traversent le canal en fonction de leur gradient de concentration et du gradient électrique, produisant ce qu'on appelle des "courants ioniques" qui changent le potentiel transmembranaire. Voici brièvement un peu d'histoire sur les principaux éléments qui ont mené à la mise en évidence du rôle des courants ioniques dans la régulation de l'activité électrique cardiaque.

Bernstein, en 1902, s'est aperçu que l'intérieur des cellules de mammifères était hautement concentré en ions K^+ . Il a émis l'hypothèse que la membrane plasmique était sélectivement perméable aux ions K^+ et que les protéines cytosoliques, chargées négativement, établissaient un équilibre en concentrant les ions K^+ dans le cytosol électronégatif. Il parlait aussi d'une neutralisation du potentiel transmembranaire lors du potentiel d'action.²⁸ Des enregistrements de potentiels intracellulaires, mesurés grâce à l'insertion de microélectrodes dans l'axone géant de calmar, ont confirmé l'hypothèse de Bernstein sur l'électronegativité dans les cellules au repos et démontré que celle-ci diminuait lors de l'excitation.²⁹ Ces enregistrements ont également mis en évidence que l'excitation des fibres de l'axone provoquait même une inversion de potentiel. On parlait à l'époque d'un "overshoot" lorsque le potentiel transmembranaire s'élevait au dessus de zéro.^{30, 31} L'inversion de potentiel a également été remarquée dans le muscle sartorius³² et le ventricule cardiaque³³ chez la grenouille.

Ainsi, il devenait donc évident que le potentiel d'action n'était pas seulement dû à la dissipation du gradient de potassium, mais que la membrane plasmique était également perméable à d'autres types d'ions. À la fin des années 1940 et au début des années 1950, Hodgkin, Huxley et Katz ont publié une série d'expériences caractérisant les bases ioniques du potentiel d'action de l'axone géant de calmar (Pour revue, voir Hodgkin, Huxley et Katz³⁴). Au lieu de mesurer les changements de potentiel transmembranaire lors du potentiel d'action, ils ont mesuré les courants requis pour maintenir la membrane à un

voltage constant. Ceci a été rendu possible en plaçant une électrode à l'intérieur de l'axone, en excitant ensuite la membrane, puis en appliquant les courants nécessaires pour maintenir le potentiel transmembranaire constant. En mesurant ces courants appliqués, Hodgkin, Huxley et Katz ont pu quantifier l'amplitude et la durée des courants ioniques impliqués dans la génération du potentiel d'action de l'axone géant de calmar. En changeant les concentrations intra- et extracellulaires de Na^+ et de K^+ , ils ont démontré que la dépolarisation avait lieu lorsque des ions Na^+ entraient dans la cellule, que la repolarisation était causée par une sortie d'ions K^+ et que l'inversion du potentiel transmembranaire au pic du potentiel d'action était due à une entrée massive d'ions Na^+ .

Dans le cœur, on retrouve principalement des canaux ioniques spécifiques au Na^+ , au K^+ , au Ca^{2+} et au Cl^- . Le tableau II illustre la concentration de ces ions à l'intérieur et à l'extérieur des myocytes cardiaques, la direction du flux passif et le type de courant qu'ils produisent ainsi que l'effet produit sur le voltage transmembrane.

Tableau II: Concentration des principaux ions à l'intérieur et à l'extérieur des myocytes cardiaques. La direction dominante du flux passif propre à chacun de ces ions est également indiquée, ainsi que le type de courant généré et l'effet sur la membrane plasmique. Adapté de Katz.¹

Ion	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)	Direction du flux passif	Courant généré	Effet sur la membrane
Ca^{2+}	10^{-5} - 10^{-4}	2	Entrant	Entrant	Dépolarisation
Na^+	5-34*	140	Entrant	Entrant	Dépolarisation
K^+	104-180*	5,4	Sortant	Sortant	Repolarisation
Cl^-	4,2**	117	Entrant	Sortant	Repolarisation

*Selon Walker³⁵

**Selon Hille³⁶

La majorité des courants ioniques responsables de la dépolarisation et de la repolarisation de la membrane plasmique sont passifs, parce qu'ils vont dans le sens de leur gradient électrochimique. Par exemple, comme les ions Na^+ sont plus concentrés à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule, ils tendent à entrer à l'intérieur de cette dernière, produisant un courant entrant. Les ions K^+ , quant à eux, produisent un courant sortant étant

donné qu'ils sont plus concentrés à l'intérieur de la cellule. On sait maintenant que ces courants ioniques traversent la membrane plasmique par l'intermédiaire de protéines transmembranaires appelées "canaux ioniques", qui forment un pore à travers la membrane plasmique et qui sont le plus souvent spécifiques à un seul type d'ions.

Le potentiel transmembranaire d'une cellule au repos est d'environ -90 mV; il est fonction des concentrations intra- et extracellulaires de chacun des ions présentés au tableau II et du gradient électrique transmembranaire. Si la membrane n'était perméable qu'à un seul type d'ion, le potentiel transmembranaire serait égal au potentiel d'équilibre de cet ion (E_{ion}), calculé selon l'équation de Nernst:³⁷

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{ion}]_e}{[\text{ion}]_i}$$

où R est la constante des gaz parfaits, T est la température absolue, z est la valence de l'ion, F est la constante de Faraday et $[\text{ion}]_e$ et $[\text{ion}]_i$ sont les concentrations extra- et intracellulaires de l'ion. Selon l'équation de Nernst, le potentiel d'équilibre pour les ions K^+ est de -86 mV alors qu'il est de $+70$, $+114$ et -80 mV respectivement pour les ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- .

1.5.1 Fonctionnement général des canaux ioniques

L'ouverture et la fermeture de la plupart des canaux ioniques exprimés dans le cœur sont dépendantes du voltage, c'est-à-dire que leur pore va s'ouvrir et se refermer de façon cyclique, en fonction des changements de potentiels transmembranaires de la cellule. Pour cette raison, on les appelle les canaux Nav, Cav et Kv, le v faisant référence à leur sensibilité au voltage. Ainsi, l'ouverture du pore correspond à l'activation du canal et laisse libre cours au passage des ions. Lorsque le pore se referme, le canal s'inactive ou se désactive et n'est plus perméable aux ions. Enfin, le canal doit éventuellement passer par un état, la réactivation, afin qu'il puisse être activé de nouveau.

Pour illustrer ce cycle d'ouverture et de fermeture des canaux ioniques dans le cœur, décrivons brièvement ce qui se passe lors du potentiel d'action. D'abord, la dépolarisation

(Phase 0) active les canaux Nav, qui s'inactivent ensuite rapidement conséquemment à l'augmentation du potentiel transmembranaire. Dans les cellules nodales, ce sont essentiellement les canaux Cav qui s'activent lors de la dépolarisation. Dans les autres régions du cœur, ces derniers sont actifs lors des phases 1 et 2 du potentiel d'action. Les canaux Kv, eux, s'activent pour certains lors de la phase 1 et pour d'autres, au cours de la phase 2. Lorsque les canaux Cav s'inactivent, il y a repolarisation par l'intermédiaire des canaux Kv. Enfin, quand la membrane cellulaire retourne à son potentiel de repos, les canaux Nav et Cav et éventuellement Kv se réactivent.¹

1.5.2 Principaux types de canaux ioniques exprimés dans le cœur

On ne retrouve pour ainsi dire qu'un seul type de canal Nav dans le cœur humain: c'est le canal hH1 ou Nav1.5, codé par le gène *SCN5A*.³⁸ Pour ce qui est des canaux Cav, les plus importants dans le système cardiovasculaire sont ceux des types L et T, retrouvés pour la première fois dans l'oreillette de chien. Les canaux Cav de type L (Cav1.2) s'activent à un potentiel transmembranaire plus élevé que ceux de type T (Cav3.1/3.2), ils s'inactivent plus lentement et ils laissent passer plus de courant.³⁹

Ce sont les canaux Kv qui sont les plus variés dans le cœur. Ils produisent des courants repolarisateurs impliqués dans les phases 1 (Kv4.3), 2 (Kv11.1, Kv7.1, Kv1.5) et 3 (Kv11.1, Kv7.1, Kv1.5) du potentiel d'action, pour la plupart, mais également dans le maintien du potentiel de repos (Phase 4) (Kir2.1). Nous discuterons des rôles de ces courants de façon plus détaillée dans la section 1.7.

Enfin, le cœur exprime aussi des canaux Cl⁻ dépendants du voltage. Plusieurs types de courants Cl⁻ ont été enregistrés dans les myocytes cardiaques chez différentes espèces. Cependant, la plupart de ces courants ne sont actifs qu'en conditions de stress.⁴⁰ Tous les canaux Cl⁻ connus jusqu'à présent sont les canaux de la famille des CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator),⁴¹ CIC-2, CIC-3 et CLCA.⁴² Les canaux CFTR raccourcissent la durée du potentiel d'action lors de fortes stimulations adrénérgiques et en présence de débits cardiaques rapides alors que les canaux CIC-2 et CIC-3 sont impliqués

dans la régulation du volume cellulaire. Pour ce qui est des canaux CLCA, ils s'activent suite à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ associée à une sortie d'ions Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique.⁴²

1.6 Pompes et échangeurs

Comme nous venons de le voir, les canaux ioniques sont nécessaires au bon fonctionnement du cœur. Cependant, des pompes et échangeurs y sont également essentiels, dont la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ et les échangeurs Na^+/Ca^{2+} et Na^+/H^+ . Ces pompes et échangeurs jouent un rôle important notamment dans la restauration et le maintien des gradients ioniques contribuant au potentiel transmembranaire et à l'excitabilité cellulaire. De plus, certains d'entre eux génèrent des courants ioniques alors que d'autres sont électroneutres.

1.6.1 Pompe $Na^+-K^+-ATPase$

La pompe $Na^+-K^+-ATPase$ régule la concentration intracellulaire d'ions Na^+ en expulsant ceux-ci de la cellule tout en faisant entrer les ions K^+ . Pour ce faire, elle doit consommer de l'énergie sous forme d'ATP étant donné qu'elle dirige les ions contre leurs gradients de concentrations. Ainsi, pour chaque molécule d'ATP consommée, la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ expulse trois ions Na^+ et fait entrer deux ions K^+ à l'intérieur de la cellule. Elle est donc électrogène, produisant un courant sortant nommé I_p .⁴³

Du point de vue structural, la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ retrouvée dans le cœur est constituée d'une sous-unité α catalytique et d'une glycoprotéine, la sous-unité β . Ce sont des protéines transmembranaires ayant respectivement dix et un domaine transmembranaire.⁴³ La sous-unité α est largement responsable de l'activité catalytique de la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ et de ses caractéristiques pharmacologiques, alors que la sous-unité β a un rôle important dans le transport, la maturation et l'insertion adéquate de la pompe dans la membrane plasmique.^{43, 44} Trois isoformes de sous-unités α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$)

et deux de sous-unités β ($\beta 1$ et $\beta 2$) ont été identifiées dans les oreillettes, les ventricules et le septum.⁴⁵

Le courant produit par la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (I_p) hyperpolarise la cellule lorsqu'elle est au repos et a un effet repolarisateur lors du potentiel d'action.⁴⁶ Au même titre que les autres courants ioniques, il a aussi un rôle à jouer dans la régulation du profil du potentiel d'action cardiaque. De fait, une étude a démontré que l'inhibition de la pompe par la dihydro-ouabaïne prolongeait la durée du potentiel d'action dans les fibres de Purkinje.⁴⁷ La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ influence également le fonctionnement de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, comme nous le verrons dans la prochaine section.

1.6.2 Échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ échange un ion Ca^{2+} pour trois ions Na^+ . Il a été identifié pour la première fois par Reuter et Seitz⁴⁸ dans le cœur et par Baker *et al.*⁴⁹ dans l'axone de calmar. Il consiste en une protéine ayant neuf hélices α transmembranaires, dont les quatre premières sont séparées des autres par un long domaine cytoplasmique nommé "f-loop". Ce dernier possède des sites de phosphorylation et de liaison à l'ATP ainsi que d'autres sites de régulation alors que les hélices α sont responsables du transport des ions Na^+ et Ca^{2+} .¹ Dans le cœur, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est retrouvé particulièrement en abondance dans les tubules T.^{50, 51} Il joue un rôle important dans la régulation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , dans le couplage excitation/contraction cardiaque et aussi dans la détermination de la durée du potentiel d'action.^{52, 53} Pour bien comprendre son fonctionnement, expliquons d'abord comment s'effectue le couplage excitation/contraction.

Dans le cœur adulte des mammifères, ce couplage, qui définit comment la dépolarisation de la membrane plasmique initie la contraction cardiaque, dépend d'interactions entre deux systèmes membranaires. Le premier est formé d'extensions de la membrane plasmique. Ce sont les tubules T, qui propagent les potentiels d'action vers l'intérieur des myocytes cardiaques. Le deuxième système, appelé "réticulum sarcoplasmique", est une région spécialisée du réticulum endoplasmique retrouvée dans les

cellules eucaryotes. Lorsque le potentiel d'action est propagé dans les tubules T, des ions Ca^{2+} , qui entrent à l'intérieur de la cellule au-travers de canaux calciques de type L, vont se fixer sur des canaux situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique et les ouvrent. Ces canaux, qui sont souvent appelés "récepteurs de la ryanodine", libèrent alors des ions Ca^{2+} qui vont se lier à la troponine C associée aux filaments d'actine, ce qui provoque la contraction cardiaque.⁵⁴

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est un antiport qui permet à l'un et l'autre de ces ions de traverser la membrane plasmique vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule, mais toujours dans des directions opposées. La direction du flux ionique dépend du potentiel transmembranaire. Au début du potentiel d'action, l'échangeur fait entrer les ions Ca^{2+} dans la cellule et sortir les ions Na^+ , ce qui crée un petit courant sortant repolarisateur. Lorsque le réticulum sarcoplasmique libère des ions Ca^{2+} au début de la contraction cardiaque et que le potentiel de membrane se repolarise, le flux ionique s'inverse, créant un courant entrant ralentissant la repolarisation.⁵⁵ Ainsi, la sortie de calcium, qui permet au cœur de relaxer, est favorisée par l'électronégativité observée lors de la diastole alors que l'entrée de calcium, qui augmente la contractilité, est mise à profit lors de la systole.¹ En d'autres termes, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ amène toujours le flux de calcium dans la direction qui permet de maintenir le cœur à l'état où il se trouve (repos ou excitation), d'où son rôle dans le couplage excitation/contraction.

Environ 80% de la sortie de calcium des cellules cardiaques est assurée par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.⁴⁸ L'énergie requise à l'échangeur pour transporter le calcium est fournie par le gradient de sodium de part et d'autre de la membrane plasmique et donc, indirectement, par la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$.⁵⁶

1.6.3 Échangeur Na^+/H^+

La production d'énergie dans le cœur génère des protons. Certains mécanismes sont donc nécessaires pour prévenir l'acidose intracellulaire, qui nuirait à la contractilité des cellules cardiaques. À l'intérieur de la cellule, le pH normal est aux environs de 7,2. Il est

maintenu grâce à l'action de certains échangeurs, dont le plus important est l'échangeur Na^+/H^+ . Celui-ci, en utilisant l'énergie du gradient de sodium, fait sortir un ion H^+ de la cellule et entrer un ion Na^+ . Par conséquent, il est électroneutre.⁵⁷ Environ 60% des protons qui doivent être expulsés des cellules cardiaques le sont grâce à cet échangeur.⁵⁸

Le cœur exprime plusieurs isoformes de l'échangeur Na^+/H^+ , mais le principal est NHE1.⁵⁹ Il est retrouvé majoritairement dans les disques intercalaires des cellules des oreillettes et des ventricules, à proximité de la connexine 43, et dans les tubules T.⁶⁰ C'est une protéine possédant un domaine à 12 segments transmembranaires responsable de l'échange ionique et un domaine cytoplasmique impliqué dans la régulation de l'échange.⁶¹

Bien qu'ayant un rôle très important dans le maintien du pH intracellulaire dans le cœur normal, l'acidose induite par l'ischémie cardiaque représente un stimulus majeur activant l'échangeur Na^+/H^+ .⁶² L'ischémie cardiaque est un manque d'oxygène et de nutriments dans les tissus cardiaques, suite au blocage d'une artère coronaire. L'activité, ainsi que les niveaux d'ARNm de l'échangeur Na^+/H^+ , sont augmentés lors de cette pathologie.⁶³ Il semble d'ailleurs que cet échangeur pourrait être potentiellement impliqué dans les effets néfastes de l'ischémie cardiaque.⁶² Tout d'abord, tel que mentionné plus haut, l'activation de l'échangeur augmente la concentration intracellulaire de Na^+ . Ensuite, l'ischémie cardiaque est reconnue pour inhiber la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$.^{62, 64} Il y a donc une augmentation importante de la concentration intracellulaire de Na^+ lors de cette pathologie, ce qui entraîne une forte entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.⁶⁵ Cette surcharge calcique, quant à elle, diminue l'excitabilité et la contractilité des cellules cardiaques, tel qu'observé lors de l'ischémie.^{66, 67}

1.7 Correspondance entre les phases du potentiel d'action et l'activité des canaux ioniques

Les niveaux d'expression des canaux ioniques dont il a été question dans les sections 1.5 et 1.6 diffèrent d'une région à l'autre du muscle cardiaque. De plus, certains canaux sont spécifiques à des régions précises du cœur. Le profil du potentiel d'action est d'ailleurs très étroitement relié à l'activité des différents canaux ioniques. Dans cette

section, nous verrons plus précisément quel est le lien entre les phases du potentiel d'action et l'activité des canaux ioniques retrouvés dans le cœur.

1.7.1 Phase 0

Dans les myocytes ventriculaires et auriculaires et les fibres de Purkinje, la phase 0 du potentiel d'action est caractérisée par le passage rapide du potentiel transmembranaire d'environ -90 mV jusqu'à $+30$ mV. Ce phénomène résulte de l'activation des canaux Nav, qui sont responsables du courant I_{Na} .⁶⁸ Il y a alors un influx rapide et massif de charges positives à l'intérieur de la cellule, causant sa dépolarisation. Les canaux Nav s'activent très rapidement lors de la dépolarisation cellulaire, à partir d'un potentiel membranaire situé entre -70 et -60 mV.⁶⁹ C'est pourquoi la dépolarisation des cellules est si rapide, c'est-à-dire entre 500 et 1000 V/sec, par exemple, dans les fibres de Purkinje.¹¹

Cependant, cette phase du potentiel d'action est beaucoup plus lente dans les cellules des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire, ce qui suggère que les canaux Nav n'ont pas un rôle prépondérant dans la dépolarisation de celles-ci. Il semble que ce serait plutôt les canaux Cav de type L qui soient responsables de la génération des potentiels d'action dans ces cellules⁴⁶ et qui réguleraient également leur automaticité. En effet, une étude a démontré que le courant $I_{Ca,L}$ était impliqué de façon significative dans la dépolarisation des cellules du nœud sinusal chez le lapin⁷⁰ et chez la souris.⁷¹ De plus, il a également été mis en évidence qu'une inhibition pharmacologique du courant $I_{Ca,L}$ ralentissait considérablement l'activité d'automatisme dans des cellules isolées du nœud sinusal de lapin, *in vitro*.⁷² Les canaux Cav de type L s'activent à partir d'un potentiel membranaire d'environ -20 mV.⁷³

1.7.2 Phase 1

La phase 1 du potentiel d'action des myocytes ventriculaires et auriculaires et des fibres de His et Purkinje est une repolarisation transitoire. Celle-ci a lieu suite à

l'inactivation des canaux Nav et à l'activation de canaux Kv responsables d'un courant potassique transitoire sortant (I_{to}), qui s'activent à un potentiel transmembranaire supérieur à -30 mV.⁷⁴ Chez l'humain, comme chez plusieurs autres espèces, il semble que deux types de courant I_{to} soient présents dans le cœur, soient $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$.⁷⁵ Les deux courants s'activent et s'inactivent rapidement, mais $I_{to,s}$ récupère de son état d'inactivation beaucoup plus lentement que $I_{to,f}$.⁷⁶ Chez l'humain, ces deux courants sont impliqués dans la phase 1 du potentiel d'action, mais $I_{to,s}$ n'est présent que dans le ventricule.⁷⁷

Un courant Cl^- , nommé I_{to2} , est aussi impliqué dans la phase 1 du potentiel d'action des ventricules et des fibres de Purkinje. Il s'agit d'un courant sortant repolarisateur dépendant du calcium,^{78, 79} qui a été découvert par Dudel *et al.* en 1967, dans les fibres de Purkinje.⁸⁰ Les myocytes auriculaires et ventriculaires de lapin possèdent un courant transitoire bloqué à plus de 80% par la 4-aminopyridine, un inhibiteur de I_{to} .⁷⁸ La composante insensible à cet inhibiteur, I_{to2} , est bloquée par la caféine et la ryanodine, deux agents affectant le relargage du calcium du réticulum sarcoplasmique. Le courant I_{to2} est par ailleurs absent lorsque la concentration en chlore est réduite. Ainsi, il a été suggéré que ce courant chlore était produit par un canal activé par le relargage du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique.⁸¹ Le canal Cl^- responsable du courant I_{to2} est du type CIC et lors d'une surcharge calcique, il est impliqué dans le développement d'arythmies cardiaques.⁸²

1.7.3 Phase 2

La phase 2 est la phase de plateau du potentiel d'action. Elle est caractérisée par un équilibre entre l'entrée et la sortie de charges positives de la cellule. L'allure et la durée de la phase de plateau sont influencées par la prééminence de la phase 1. Plus cette prééminence est marquée, comme dans les myocytes de l'oreillette, par exemple, plus le plateau sera incliné et court. Dans les myocytes ventriculaires et auriculaires et les fibres de Purkinje, l'entrée de charges positives se fait principalement grâce aux canaux Cav de type L.⁸³ Ceux-ci semblent être exprimés partout dans le cœur des mammifères.⁸⁴ L'entrée des ions Ca^{2+} par les canaux Cav de type L provoque un relargage de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, qui coïncide avec le début de la contraction cardiaque.⁸⁵

L'entrée de charges positives (ions Ca^{2+}), qui tend à dépolariser la cellule, est contrebalancée par la sortie d'ions K^+ au travers de canaux potassiques repolarisateurs responsables de courants sortants, qui s'activent à un potentiel transmembranaire d'environ -30 mV. Deux courants potassiques repolarisateurs, soient I_{Kr} (produit par le canal Kv11.3) et I_{Ks} (produit par Kv7.1) sont souvent rencontrés dans le cœur de nombreuses espèces et ils s'activent respectivement de façon relativement rapide et lente.⁸⁶ Cependant, chez certaines espèces ou dans certains types de cellules, seul le courant I_{Kr} ou I_{Ks} est présent. Par exemple, les deux courants sont exprimés dans les oreillettes et les ventricules chez le cochon d'Inde⁸⁶⁻⁸⁸ et l'humain⁸⁹⁻⁹¹ ainsi que dans les ventricules de chien.^{92, 93} Par contre, seul le courant I_{Kr} est présent dans les oreillettes et les ventricules de rat.⁹⁴ Chez l'humain, outre les courants I_{Kr} et I_{Ks} , le courant ultra rapide I_{Kur} (produit par le canal Kv1.5) est aussi en partie responsable de la repolarisation des myocytes de l'oreillette.⁹⁵

Ensuite, le courant I_{KATP} (produit par Kir6.2/SUR2A) peut être impliqué lors de la phase 2 du potentiel d'action dans des circonstances particulières. Dans les myocytes ventriculaires, il joue un rôle important lors de stress métaboliques comme ceux occasionnés par l'ischémie cardiaque, par exemple, en raccourcissant la durée du potentiel d'action et en augmentant la sortie de potassium.^{96, 97} Le courant I_{KATP} est inhibé par l'ATP intracellulaire et activé par une diminution du rapport ATP/ADP à l'intérieur de la cellule.⁹⁷ Le courant I_{KATP} est également présent dans les oreillettes.⁹⁸ Enfin, lors de stimulations par un agoniste cholinergique, le courant I_{KAch} (Kir3.1/3.4), sensible à l'acétylcholine, peut aussi intervenir lors de la phase 2; dans un tel cas, la durée du potentiel d'action est réduite et les myocytes sont moins excitables.⁹⁹

1.7.4 Phase 3

Les canaux Cav de type L s'inactivent lors de la phase 3 du potentiel d'action et la sortie d'ions K^+ par les canaux potassiques repolarisateurs devient plus importante, ce qui provoque une repolarisation assez rapide de la cellule. Dans les myocytes auriculaires et ventriculaires et les fibres de Purkinje, les principaux courants potassiques repolarisateurs mis en jeu à la phase 3 sont les mêmes que ceux qui sont impliqués dans la phase de

plateau, soit, tel que mentionné plus haut, I_{Kur} dans l'oreillette et I_{Kr} et/ou I_{Ks} dans le ventricule, les fibres de Purkinje et les oreillettes. Les courants I_{Kr} et I_{Ks} sont également impliqués dans la repolarisation des cellules du nœud sinusal et le courant I_{Kr} , dans la repolarisation des cellules du nœud auriculo-ventriculaire. Finalement, un courant potassique non dépendant du temps est aussi impliqué dans la repolarisation ventriculaire et auriculaire, bien qu'étant exprimé en plus grande quantité dans le ventricule:⁹⁰ il s'agit de I_{KI} .^{100, 101} Ce courant est produit par le canal Kir2.1 et il est impliqué dans la dernière partie de la phase 3: il agit sur la durée du potentiel d'action et l'intervalle QT.¹⁰²

1.7.5 Phase 4

La phase 4 est celle du potentiel de repos, soit approximativement -90 mV. À la fin du potentiel d'action, la cellule est repolarisée et de nouveau excitable. I_{KI} , un courant potassique décrit un peu plus haut, est le principal courant impliqué dans le maintien du potentiel de repos.^{103, 104} Deux autres courants, soient I_{KAch} et I_{KATP} , peuvent éventuellement intervenir dans le maintien du potentiel de repos, respectivement lors de stimulations par un agoniste cholinergique et lors d'une réduction intracellulaire du rapport ATP/ADP comme pendant une ischémie.^{96, 97, 105, 106} La pompe Na^+, K^+ -ATPase ainsi que l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont aussi impliqués dans le rétablissement du potentiel de repos.¹⁰³ En atteignant le potentiel de repos, les cellules du nœud sinusal se dépolarisent automatiquement jusqu'au seuil d'ouverture des canaux calciques.¹⁰⁷ Parmi les mécanismes responsables de cet automatisme, on retrouve notamment l'activation du courant pacemaker I_f ¹⁰⁸ et la désactivation du courant I_{Kr} .¹⁰⁹

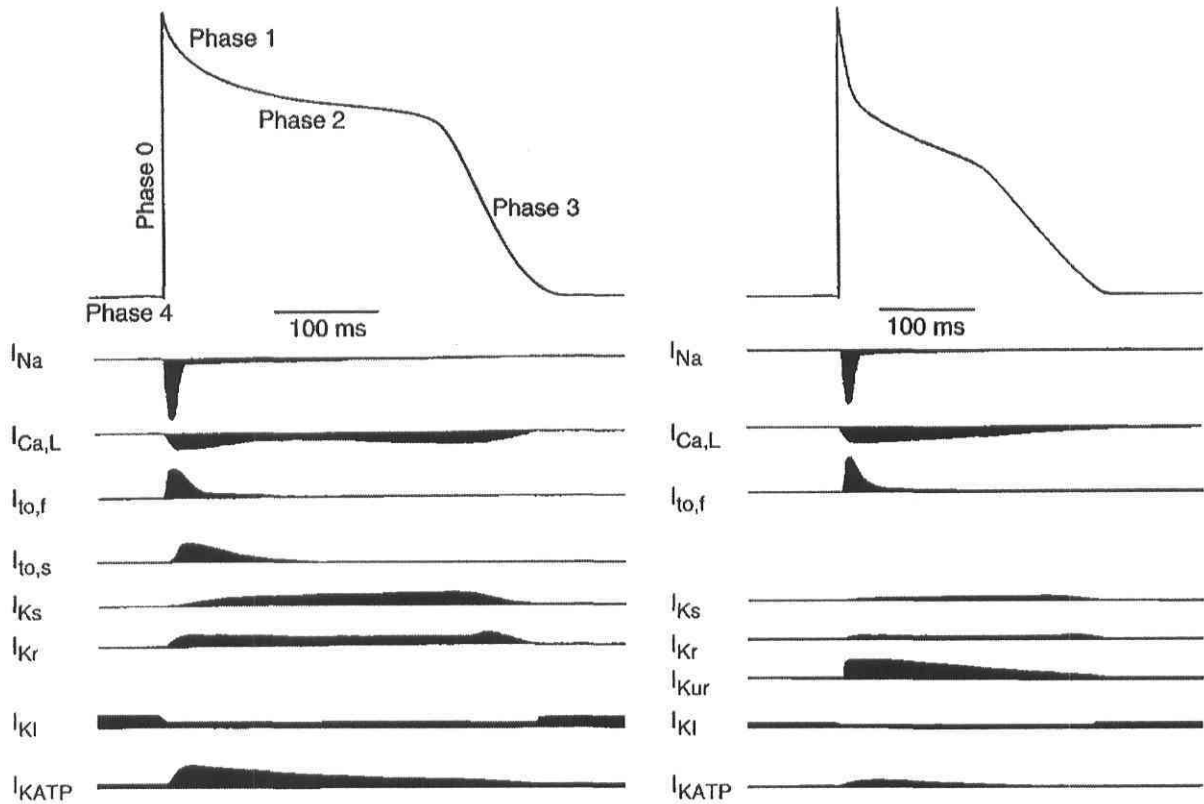


Figure 4. Distribution des principaux courants ioniques à chacune des phases du potentiel d'action dans les ventricules (gauche) et les oreillettes (droite). Les courants orientés vers le bas sont des courants entrants alors que ceux qui sont orientés vers le haut sont des courants sortants. Adaptée de Nerbonne et Kass.¹⁰¹

2. Canal potassique hKv1.5

Les canaux potassiques sont un groupe de macromolécules transmembranaires formant des pores hautement sélectifs aux ions K^+ et qui représentent une classe des plus diversifiée de canaux ioniques activés par le voltage, en termes de structure et de fonction.^{110,111} Une caractéristique importante des canaux potassiques est qu'ils peuvent s'ouvrir et se refermer en fonction du potentiel transmembranaire.¹¹² Ce sont des canaux dits "rectifiants", car leur aptitude à produire un courant ionique est influencée de manière non linéaire par le potentiel transmembranaire.¹¹³ On les retrouve dans tous les organes, incluant le cœur, les muscles lisses, le cerveau, le pancréas, les reins, les poumons et les muscles squelettiques. Les canaux potassiques produisent la repolarisation dans les tissus excitables.¹¹² De ceux-ci, par exemple, hKv1.5 est retrouvé particulièrement en abondance dans l'oreillette humaine,¹¹⁴ où il joue un rôle déterminant dans la repolarisation et la durée de la phase de plateau du potentiel d'action cardiaque.^{112,115} Le nom du canal réfère à sa provenance (h pour humain), sa fonction (K pour canal potassique), sa dépendance au voltage (v) et la famille à laquelle il appartient (1.5, c'est-à-dire famille 1 (*Shaker*), membre 5). La figure 5 représente les arbres phylogénétiques des familles de canaux potassiques dépendants du voltage.

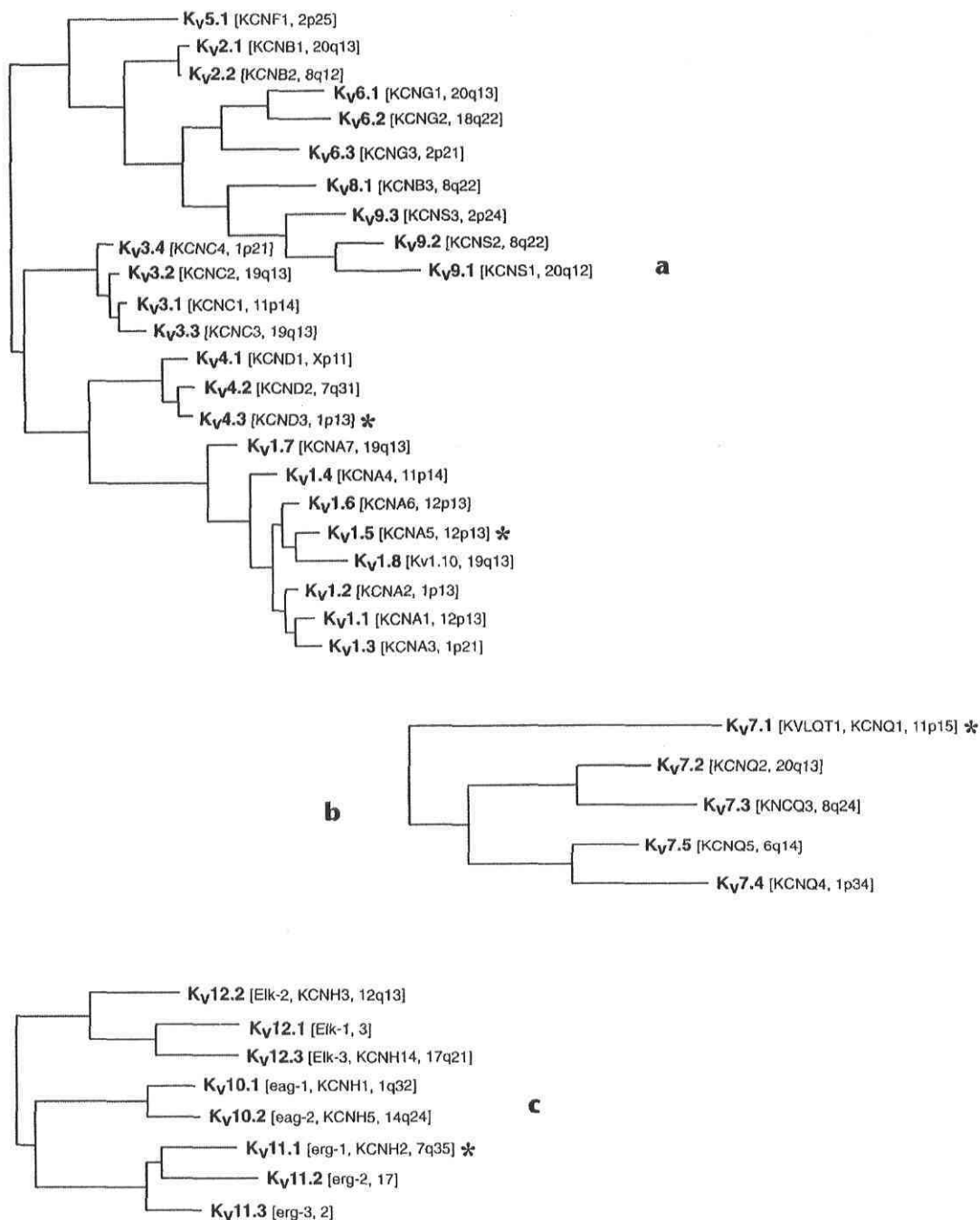


Figure 5. Arbres phylogénétiques des canaux Kv. Les familles Kv1-Kv6 et Kv8-Kv9 sont montrées en a, la famille Kv7 en b et les familles Kv10-Kv12 en c. Les canaux potassiques pertinents pour l'électrophysiologie cardiaque sont marqués d'un astérisque. D'autres noms donnés à ces différents canaux ioniques sont indiqués entre crochets, de même que le locus chromosomique sur lequel se trouve le gène codant pour chacun d'eux chez l'homme. Adaptée de "The IUPHAR compendium of voltage-gated ion channels".¹¹⁶

2.1 Séquence nucléotidique et localisation dans le génome humain

Le gène codant pour le canal hKv1.5, appelé *hKv1.5*, est situé sur le chromosome 12p13.¹¹⁷ Il a une taille de 1842 pb, n'a qu'un seul exon, et sa séquence nucléotidique figure au numéro d'accès NT_086792 sur le site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). On peut également voir la séquence d'ARNm de *hKv1.5* sur le site du NCBI, par exemple aux numéros d'accès NM_002234, M60451 et M83254.

Le gène *Kv1.5* de l'humain (*hKv1.5*) est très semblable à celui d'autres espèces animales. Par exemple, son taux d'identité aux gènes *Kv1.5* du rat et de la souris est de 85% et, par rapport à celui du chien, il est de 90%. Au niveau de la protéine, on note 83% d'identité et 86% de similarité par rapport aux protéines du rat et de la souris. Lorsque l'on compare la protéine humaine à celle du chien, on remarque 85% d'identité et 87% de similarité. Les comparaisons de séquences nucléotidiques et peptidiques ont été faites à l'aide des programmes blastn et blastp accessibles sur le site internet NCBI. Les séquences d'ARNm à partir desquelles les alignements ont été faits figurent sur le site NCBI aux numéros d'accès NM_002234, _145983, _012972 et _001006645 pour l'humain, la souris, le rat et le chien (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2 Structure du canal hKv1.5

Le produit du gène *hKv1.5* est une protéine transmembranaire de 605 acides aminés¹¹⁸ d'un poids moléculaire de 66 640 Da, qu'on appelle la sous-unité α du canal hKv1.5. Celle-ci est constituée de six segments transmembranaires hydrophobes (S1 à S6) reliés entre eux par des chaînes d'acides aminés et flanqués de deux longues extrémités NH₂- et COOH-terminales intracellulaires. Le segment transmembranaire S4 contient des acides aminés chargés positivement et sert de senseur de voltage.¹¹⁹ La chaîne peptidique reliant les segments S5 et S6, pour sa part, traverse deux fois la membrane cellulaire et forme le pore du canal (région P).

Dans le pore des canaux potassiques, il y a une région hautement conservée qui sert de filtre sélectif aux ions K^+ . Plus spécifiquement, une séquence de trois acides aminés, GYG, a été retrouvée dans presque tous les canaux potassiques clonés et des expériences de mutagenèse dirigée sur cette séquence ont mené à la perte de la sélectivité aux ions K^+ .¹²⁰ Pour hKv1.5 comme pour plusieurs autres canaux potassiques dépendants du voltage, cette séquence s'étend à huit acides aminés, soient TMTTVGYG.¹¹² Cette séquence signature est située entre les acides aminés 477 et 484 dans le canal hKv1.5.¹¹²

La structure présumée d'une sous-unité α est montrée à la figure 6A. Elle est basée sur d'importantes homologies de séquences entre les canaux Shaker de la mouche *Drosophila melanogaster* et plusieurs canaux potassiques de mammifères (i.e. les canaux potassiques de type Shaker). Par exemple, la séquence peptidique du canal Shaker D de la mouche (transcrit variant D, numéro d'accès NM_167592 sur le site NCBI) est 68% identique et 79% similaire au canal Kv1.5 de l'humain.

Les gènes codant pour les canaux Shaker de *Drosophila melanogaster* sont situés sur le chromosome X de la mouche, sur une unité de transcription de plus de 110 Kb qu'on appelle le locus *Shaker*. Grâce à des mécanismes d'épissage différentiel et alternatif, ce locus peut être exprimé en une famille de protéines différentes, mais de fonctions apparentées. Le calcul des indices d'hydropathie, qui permet de détecter les groupements aminés hydrophiles et hydrophobes, a mis en évidence que plusieurs de ces protéines avaient six segments transmembranaires¹²¹ et leur structure a été schématisée tel que montré à la figure 6A.

Le canal hKv1.5 est formé de l'assemblage de quatre sous-unités α identiques: c'est un tétramère. À cet effet, un modèle général a été mis au point, selon lequel un canal potassique fonctionnel serait constitué de telle façon. Ce modèle découle d'études d'interactions entre la toxine de scorpion et des canaux Shaker de *Drosophila melanogaster* de type sauvage et mutés (insensibles à la toxine) combinées à la technique de microscopie électronique,^{122, 123} qui ont mis en évidence que ces canaux étaient des tétramères. Comme dans le cas de la structure présumée de la sous-unité α , il a été déduit que tous les canaux potassiques de type Shaker formaient probablement des tétramères du fait de leurs homologies de séquences.

Chez les canaux potassiques de type Shaker, dont hKv1.5, l'assemblage en un tétramère se fait par la liaison entre les régions P¹²⁴⁻¹²⁷ et les portions cytoplasmiques des segments transmembranaires S5 et S6,¹²⁸⁻¹³⁰ tel qu'indiqué à la figure 6B.

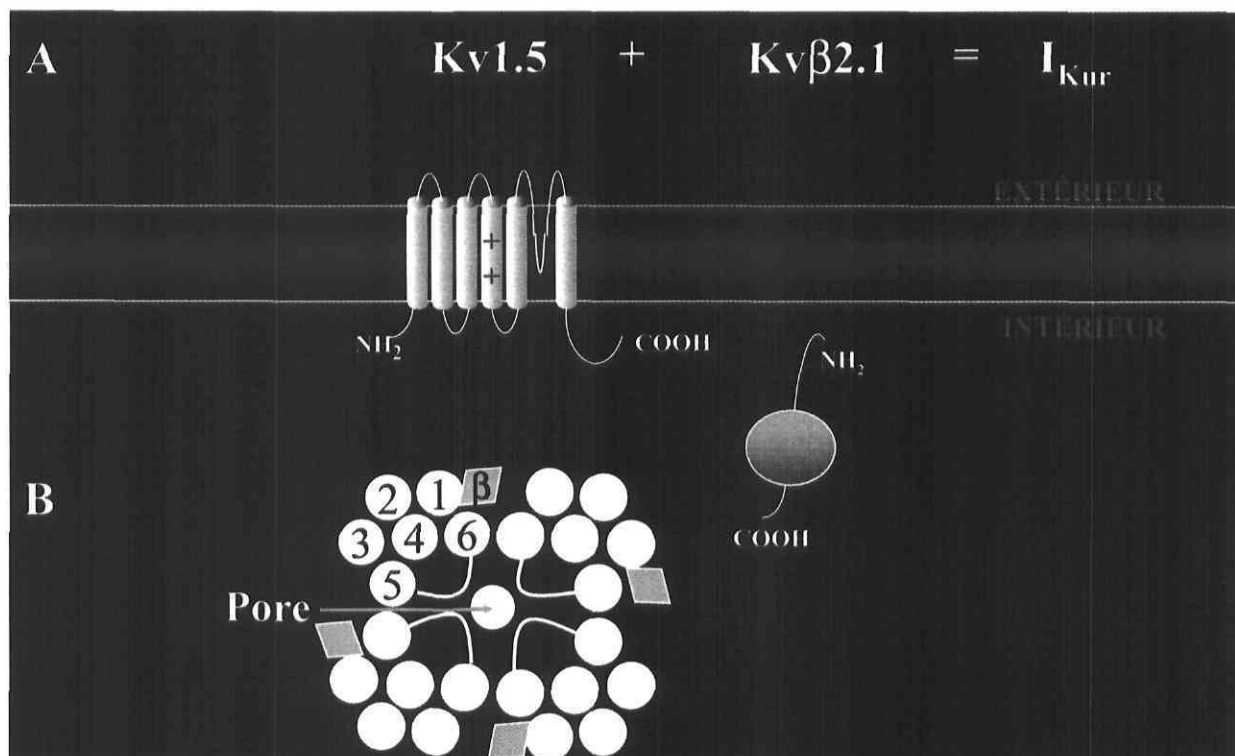


Figure 6: A. Structure des protéines transmembranaires formant les sous-unités α et β qui, en s'associant l'une à l'autre, produisent le courant potassique I_{Kur} . La sous-unité α (hKv1.5) est constituée de six segments transmembranaires dont le quatrième, qui est porteur d'acides aminés chargés positivement, sert présumément de senseur de voltage. Entre les cinquième et sixième segments transmembranaires se trouve une région qui est impliquée dans la formation du pore du canal potassique hKv1.5. La protéine hKv β 2.1 est cytoplasmique et représente l'une des sous-unités β pouvant s'associer à la sous-unité α dans le cœur humain. B. Vue transversale du canal, qui est formé de quatre sous-unités α assemblées entre elles par leurs segments transmembranaires 5 et 6. Le pore du canal est indiqué à l'aide d'une flèche.

La figure 6A représente le modèle de sous-unité α le plus communément décrit dans la littérature actuelle pour les canaux potassiques de type Shaker. Cependant, il y a quelques années, Jiang *et al.*¹³¹ ont proposé un autre modèle après avoir déterminé la

structure cristallisée du canal potassique KvAP de l'archaeobactérie thermophile *Aeropyrum pernix*. La séquence en acides aminés de ce canal est très semblable à celles des canaux Kv des eucaryotes et KvAP a les mêmes propriétés électrophysiologiques que ces derniers.¹³² Le modèle proposé par Jiang *et al.* pour la sous-unité α du canal KvAP est montré à la figure 7. Selon ce modèle, les segments S1 et S2 des sous-unité α formant le tétramère sont situées contre le pore du canal; les senseurs de voltage (S3(b) et S4), attachés de façon flexible aux segments S2 et S5 via la boucle S3 et le linker S4-S5, flottent dans la membrane à l'interface protéine-lipide et peuvent bouger librement lorsque le canal s'active; finalement, les segments S5 et S6 sont positionnés de façon à entourer le flux ionique traversant le pore.¹³³

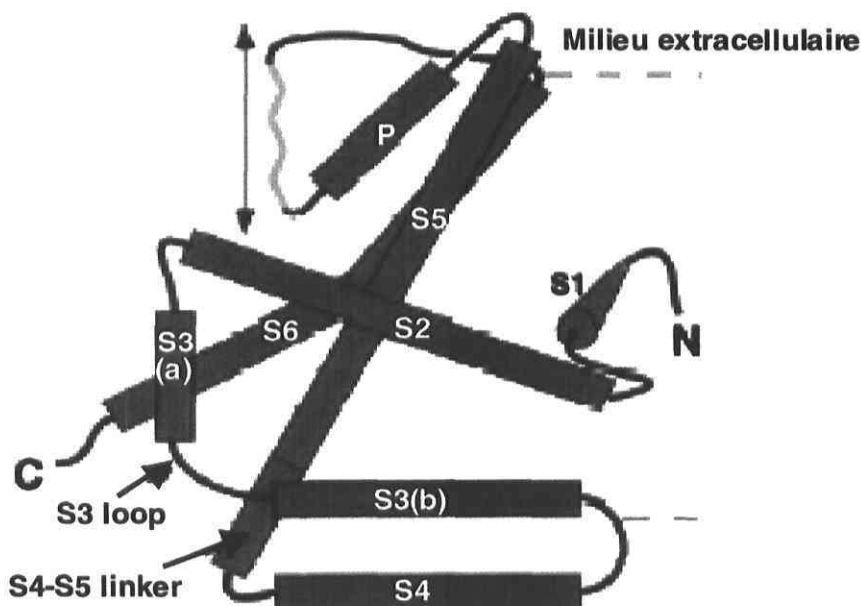


Figure 7. Modèle de la sous-unité α du canal potassique KvAP d'*Aeropyrum pernix*. Les segments S1 et S2 sont situés contre le pore. Le segment S3 est formé de deux hélices α (S3(a) et S3(b)) séparées par une boucle (S3 loop). Les senseurs de voltage (S3(b) et S4) sont situés à l'interface protéine-lipide et sont reliés aux segments S2 et S5 par la boucle S3 et le linker S4-S5. Le trait orange représente le filtre sélectif et la flèche indique la direction du flux ionique. Adaptée de Jiang *et al.*¹³¹

Le modèle conventionnel d'activation des canaux dépendants du voltage stipule que le segment S4 (senseur de voltage) sort vers l'extérieur et fait une rotation lors de l'activation, sans changer l'orientation des autres composantes du canal. Cependant, selon le modèle de Jiang *et al.*,¹³¹ lorsque le canal s'active, les senseurs de voltage se réorientent dans la membrane en tirant sur le linker S4-S5 et sortent vers l'extérieur du canal, ce qui fait ouvrir le pore.¹³³ La figure 8 illustre ces deux modèles d'activation.

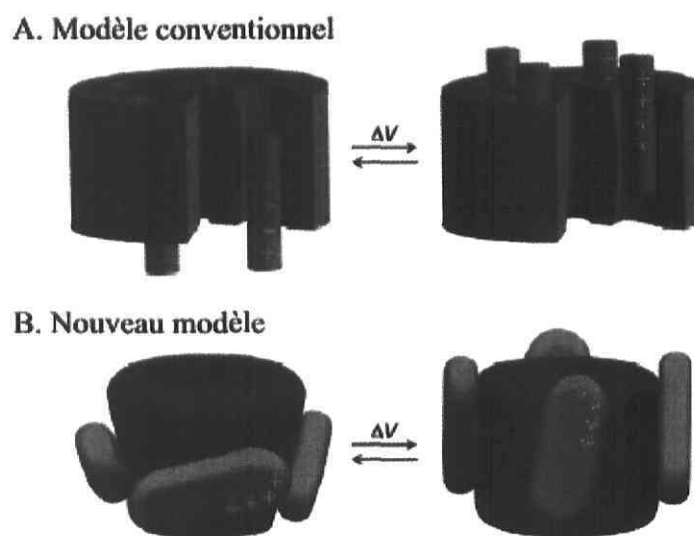


Figure 8: **A.** Modèle conventionnel d'activation des canaux dépendants du voltage, selon lequel le senseur de voltage, chargé positivement, sort vers l'extérieur et se retourne en faisant ouvrir le pore, sans aucun autre changement de conformation du canal. **B.** Le nouveau modèle propose que les senseurs de voltage se réorientent de près de 90° et poussent sur la membrane plasmique de façon à faire ouvrir le pore du canal lors de l'activation. Adaptée de Jiang *et al.*¹³¹

2.2.1 Formes pleine longueur et tronquée de hKv1.5

Deux formes de hKv1.5 ont été identifiées dans l'oreillette humaine: la forme pleine longueur et une forme tronquée.^{114,118} En fait, la présence d'un codon d'initiation à la position 210 de la protéine pleine longueur permet l'expression d'un canal dont l'extrémité

NH₂-terminale est tronquée et qu'on nomme hKv1.5ΔN209.¹³⁴ Il a aussi été suggéré que cette forme du canal hKv1.5 résulterait d'une protéolyse post-traductionnelle dans les cellules de mammifères.¹³⁵

La région tronquée dans hKv1.5ΔN209 inclut une portion importante du domaine T1.¹³⁶ Ce dernier est une région cytosolique hautement conservée chez les canaux potassiques dépendants du voltage.¹³⁷ Il joue un rôle important notamment dans la stabilité du canal¹³⁵ ainsi que dans les propriétés d'activation et d'inactivation.¹³⁴ Dans les canaux intacts, le domaine T1 est aligné avec le pore du canal.¹³⁸ La figure 9 montre la structure bi-dimensionnelle des canaux intact (FL hKv1.5) et tronqué (hKv1.5ΔN209).

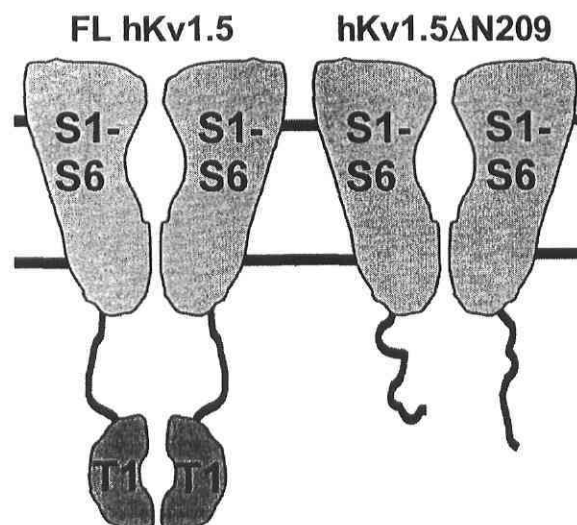


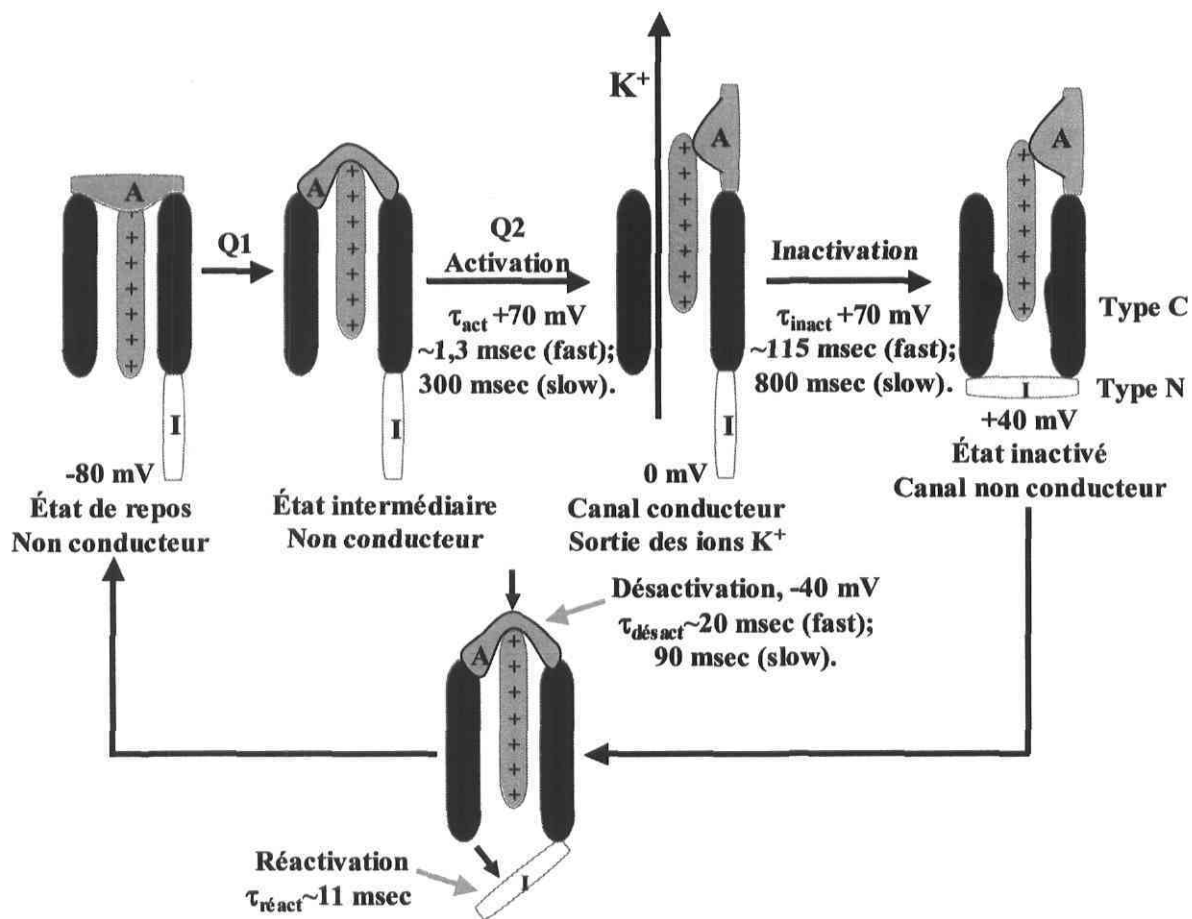
Figure 9. Structure bi-dimensionnelle d'un canal hKv1.5 intact (FL hKv1.5, pleine longueur) et tronqué (hKv1.5ΔN209). Le domaine T1 est aligné sous le pore dans le canal intact, alors qu'il est tronqué en grande partie dans le canal hKv1.5ΔN209. Adaptée de Kurata *et al.*¹³⁷

2.3 Propriétés électrophysiologiques de hKv1.5

Le modèle classique de Hodgkin-Huxley pour le canal potassique rectifiant retardé dans l'axone du calmar a décrit deux états de conductance des canaux potassiques en réponse au changement de voltage transmembranaire:¹⁰ l'état "permissif" correspondant à

l'activation du canal suite à la dépolarisation et l'état "non permissif", qui est la fermeture du canal. Plus tard, il a été proposé que les canaux potassiques pouvaient passer par trois états de conduction:¹³⁹ fermé → ouvert → inactivé. Lorsque le canal est ouvert, les ions K^+ peuvent traverser le pore, mais ils ne le peuvent plus lorsque le canal est fermé ou inactivé. Les transitions entre ces trois états dépendent du potentiel transmembranaire et du temps.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Les canaux potassiques rectifiants retardés, dont hKv1.5, s'activent avec un certain délai suivant l'application d'un voltage de dépolarisation,¹¹⁴ d'où le terme "retardés". Ce délai indique que les canaux, avant de s'ouvrir, passent par des états non conducteurs dépendants du voltage.^{140,142,143} Le canal potassique hKv1.5 est responsable du courant rectifiant retardé ultra-rapide I_{Kur} .^{114, 144-146} Ce courant s'active rapidement et s'inactive très peu et très lentement. Il passe également par les états dits de réactivation, puis de désactivation. La figure 10 représente, à l'aide d'un système imagé de portes, les différents états de conduction du canal hKv1.5.



2.3.1 Activation

Le canal hKv1.5 commence à s'activer à des voltages supérieurs à -30 mV et sa vitesse d'activation augmente rapidement avec la dépolarisation.¹⁴⁷ Par exemple, les constantes de temps d'activation rapide (τ_{fast}) de hKv1.5 obtenues par une modélisation mathématique bi-exponentielle sont respectivement, en moyenne, de 16.1 ± 3.4 et 4.3 ± 3.1 msec à -20 et $+20$ mV.¹⁴⁸ De plus, le courant s'active après un certain délai, ce qui donne à la courbe d'activation une allure sigmoïdale.¹⁴⁷

Tel que mentionné plus haut, le segment S4 de chacune des sous-unités α formant les canaux potassiques dépendants du voltage détecte les changements de potentiel transmembranaire de la cellule. Il contient un acide aminé chargé positivement (lysine ou arginine) à toutes les trois positions, le reste étant constitué d'acides aminés non chargés.^{119,149,150} Il a été démontré que des mutations neutralisant les résidus chargés du segment S4 réduisent la sensibilité au voltage.^{119, 149, 151} Toutefois, des mutations n'affectant pas le nombre de charges dans cette région ont également altéré la dépendance de l'activation au voltage.^{119, 152-154} Par une combinaison des techniques de marquage fluorescent spécifique de site et de voltage clamp, une étude a démontré un mouvement des charges du segment S4 vers l'extérieur de la cellule, lors de la dépolarisation.¹⁵⁵ Ce mouvement de charges permet le passage d'un courant sortant accompagnant l'ouverture du canal: c'est l'activation.

Le segment S6 des canaux potassiques dépendants du voltage est également important lors de l'activation. Au niveau moléculaire, le segment S6 a été identifié comme étant un constituant potentiel du pore.¹²⁹ Liu *et al.*¹⁵⁶ ont démontré que les résidus 470 à 477 de la région S6 du canal potassique Shaker devenaient accessibles seulement lorsqu'il était à l'état activé, suggérant que le mouvement d'une "porte" intracellulaire régulerait l'accès au pore. Plus précisément, il semble que cette "porte" serait située entre les résidus 470 et 474.¹⁵⁶ En fait, le déplacement du senseur de voltage induirait la rotation des segments S6 de chacune des sous-unités α , ce qui créerait l'ouverture du canal.^{157, 158}

Par ailleurs, des études de mutagenèse dirigée ont démontré que certaines mutations dans la région cytoplasmique du segment transmembranaire S6 de hKv1.5 altéraient la

stabilité de la porte d'activation, ce qui influencerait la rotation des segments S6 lors de l'ouverture du canal.¹⁵⁸ Par exemple, les mutations T505I, T505V, V512A et V512M ont causé un décalage de la courbe d'activation vers des voltages plus négatifs ainsi qu'un ralentissement de la fermeture du canal.¹⁵⁸

2.3.2 Inactivation

L'inactivation du canal potassique hKv1.5 est très lente, partielle et n'a lieu qu'à des voltages de forte dépolarisation.¹⁴⁷ Par exemple, lorsque le canal est exprimé dans des cellules CHO, sa constante de temps d'inactivation rapide (τ_{fast}) à +40 mV, obtenue par une modélisation mathématique bi-exponentielle, est en moyenne de 336 ± 95 ms.¹⁴⁸ De plus, contrairement aux cinétiques d'activation, les cinétiques d'inactivation de hKv1.5 montrent une dépendance très modeste au voltage.¹⁴⁷

Il existe deux types principaux d'inactivation chez les canaux potassiques dépendants du voltage: le type N est une inactivation rapide qui implique l'occlusion de la face intérieure du pore par une structure en forme de boule à l'extrémité de la région N-terminale; le type C, pour sa part, est une inactivation généralement plus lente qui est causée par une constriction de la face extérieure du pore du canal,¹⁵⁹⁻¹⁶¹ suite à la réorientation de certains acides aminés dans cette région.¹⁶² Les deux types d'inactivation s'opèrent chez le canal Shaker H4 de *Drosophila melanogaster*. Les mécanismes impliqués dans l'inactivation de type C ont été mieux compris grâce à une étude faite sur le canal Shaker H4: Δ 6-46 (délétion de la portion du canal responsable de l'inactivation de type N^{161, 163}). Selon cette étude, il semble que les chaînes latérales des acides aminés des positions 448, 449 et 450 sont cachées dans la phase aqueuse du canal lorsque celui-ci est à l'état fermé ou ouvert, mais qu'elles se réorientent en direction du pore lors de l'inactivation de type C, créant la formation de ponts disulfure en position 448.¹⁶² Il a été proposé que lors de ce type d'inactivation, les canaux Kv occuperaient au moins trois états conformationnels: un état initial ouvert hautement sélectif aux ions K^+ , un état moins perméable à ce type d'ions et plus perméable aux ions Na^+ et, enfin, un état non conducteur.^{164, 165}

Plus récemment, une autre forme d'inactivation lente, le type U, a été caractérisée chez plusieurs canaux potassiques dépendants du voltage, dont Shaker et Kv3.1.¹⁶⁶ L'inactivation de type U est à son maximum à des potentiels transmembranaires où seule une fraction des canaux sont ouverts, et est moins prononcée à des potentiels plus positifs.¹⁶⁶ La courbe de ce type d'inactivation en fonction du voltage est donc en forme de U, d'où son appellation. Certaines études suggèrent que hKv1.5 pourrait avoir une inactivation de type C et de type U. En effet, le canal hKv1.5 pleine longueur a une inactivation de type C^{147, 167} alors que hKv1.5 Δ N209 montre une inactivation de type U.¹³⁴ D'ailleurs, l'inactivation de type U a été associée à des délétions dans le domaine T1. Kurata *et al.*¹³⁷ ont démontré qu'une délétion des 42 premiers acides aminés du domaine T1 de Kv1.5 était suffisante pour entraîner une inactivation de type U. La figure 11 illustre un schéma de hKv1.5 montrant les régions importantes du canal ainsi que des acides aminés qui sont impliqués dans l'activation et l'inactivation.

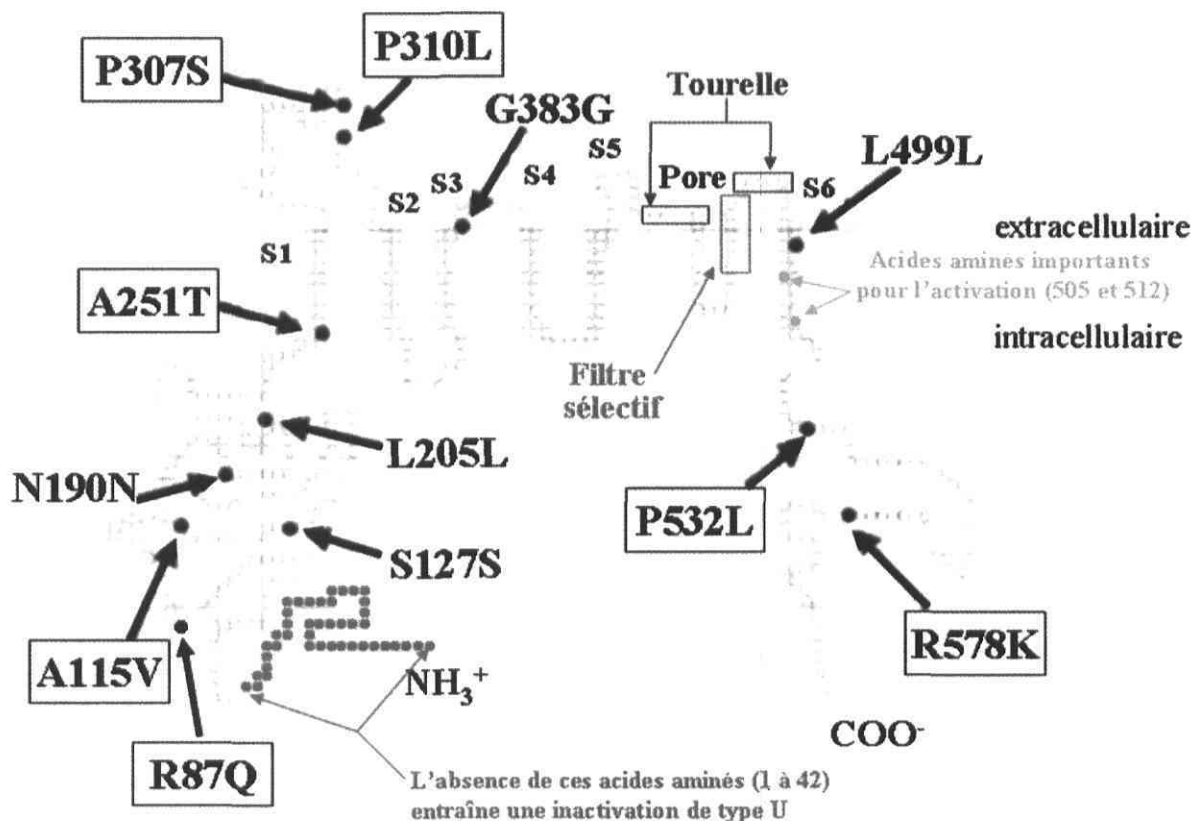


Figure 11. Schéma de hKv1.5 illustrant les régions importantes du canal (segments transmembranaires S1 à S6, pore, tourelle, filtre sélectif) ainsi que des résidus impliqués dans l'activation et l'inactivation. La position de certains polymorphismes identifiés dans hKv1.5 y est également indiquée; les polymorphismes encadrés sont ceux qui induisent un changement dans la séquence peptidique. Voir la section 3.8 et le chapitre 2 pour plus de détails au sujet des polymorphismes retrouvés dans hKv1.5. Adapté de Simard *et al.* ¹⁶⁸

On constate donc que l'extrémité NH₂-terminale de hKv1.5 est très importante dans le contrôle de l'inactivation. Elle interagit avec des protéines régulatrices, les sous-unités β , qui modulent les cinétiques d'inactivation et qui imitent en quelque sorte l'inactivation de type N.¹⁶⁹ Trois sous-unités β , soient hKv β 1.2 (originellement appelée Kv β 3), hKv β 1.3 et Kv β 2.1, peuvent interagir avec l'extrémité NH₂-terminale de hKv1.5, altérant l'amplitude et la vitesse d'inactivation du canal.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Ces trois sous-unités β sont cytoplasmiques et sont exprimées dans le cœur, tant au niveau des oreillettes que des

ventricules.^{170, 172, 173} Cependant, l'inactivation induite par une sous-unité β est généralement partielle. C'est ce qui explique pourquoi le canal hKv1.5 ne s'inactive pas complètement. En effet, les sous-unités β , dont hKv β 1.2 et hKv β 1.3, ne semblent pas se lier de façon très stable à la sous-unité α , c'est-à-dire qu'elles vont et viennent entre l'intérieur et l'extérieur du pore, ce qui fait que le canal peut se réouvrir sporadiquement au cours de l'inactivation et produire ce qu'on appelle des courants transitoires.¹⁷⁰ Ainsi, l'inactivation ne peut être complète tant et aussi longtemps que les canaux ont la possibilité de se rouvrir.¹⁷⁰

Les sous-unités hKv β 1.2 et hKv β 1.3 induisent toutes deux une inactivation partielle chez hKv1.5, mais celle-ci est plus importante en présence de hKv β 1.2.¹⁷⁰ En plus d'induire une inactivation plus importante, hKv β 1.2 ralentit considérablement la désactivation et provoque un décalage de la courbe d'activation en fonction du voltage vers des voltages plus négatifs.¹⁷³ La sous-unité Kv β 2.1, pour sa part, augmente l'inactivation de hKv1.5, accélère l'activation et provoque un décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des voltages plus négatifs.¹⁷¹

2.3.3 Désactivation et réactivation

Avant de pouvoir s'activer de nouveau, le canal hKv1.5, comme tous les canaux ioniques dépendants du voltage, doit se désactiver suite à l'activation. La désactivation a lieu lorsque la cellule est repolarisée. C'est une phase au cours de laquelle le canal redevient à l'état de repos. La désactivation se caractérise par le retour du segment S4 à sa position initiale dans la membrane cellulaire suite à l'activation du canal, à la sortie des ions K^+ et à la repolarisation.¹⁴³

Chez certains canaux potassiques de type Shaker, le segment S4 est en quelque sorte "immobilisé" de façon temporaire avant de pouvoir reprendre sa position initiale.¹⁷⁴ Cette immobilisation a lieu lors des inactivations de types N et C.^{174, 175} Dans le cas du canal hKv1.5, par exemple, la réactivation correspond à la dissociation des sous-unités α et β . Elle est aussi illustrée par la réouverture de la "porte" d'inactivation sur la figure 9. En

d'autres mots, c'est une étape qui permet au canal de "récupérer" de son état d'inactivation. Pour hKv1.5, la désactivation et la réactivation se produisent rapidement et presque simultanément.

2.4 Mécanismes de modulation de hKv1.5

En plus d'être dépendante du voltage membranaire, l'activité du canal hKv1.5 peut être modulée par différents facteurs. Il y a la modulation par les kinases, qui phosphorylent certains acides aminés sur les sous-unités α et β . Cette forme de modulation est très importante dans la régulation de la fonction cardiaque.¹⁷⁶ L'activité de hKv1.5 peut également être modulée par le pH, des ions, des espèces réactives de l'oxygène et les androgènes. Par ailleurs, il y a aussi des protéines accessoires qui influencent le degré d'expression du canal à la surface de la cellule en contrôlant son transport et la formation d'un canal fonctionnel. Par exemple, le transport du canal vers la surface de la cellule peut être modulé par la présence de sous-unités β ¹⁷⁷ et les protéines SAP97¹⁷⁸ et KCHIP2, qui contribue également à la formation de canaux Kv1.5 fonctionnels.¹⁷⁹

2.4.1 Modulation par les kinases

Les protéines kinases A et C jouent un rôle important dans la transduction de signaux α - et β -adrénergiques dans le cœur.^{180, 181} La stimulation des récepteurs α -adrénergiques active la PKC^{180, 181} alors que la stimulation des récepteurs β -adrénergiques active la PKA en augmentant les concentrations intracellulaires d'AMPc.¹⁸⁰ Une étude électrophysiologique faite sur des myocytes auriculaires humains a démontré que le courant I_{Kur} était augmenté et inhibé respectivement par une stimulation des récepteurs β - et α -adrénergiques.¹⁷⁶ Ces effets seraient attribuables aux protéines kinases A et C.¹⁷⁶

Les séquences d'ADNc de canaux hKv1.5 clonés^{114, 118} possèdent des sites de phosphorylation par la PKA et la PKC, tout comme celles des sous-unités Kv β 1.2 et Kv β 1.3.^{182, 183} Cependant, il semble que la modulation du courant I_{Kur} par ces protéines

kinases soit dépendante de la sous-unités β avec laquelle le canal s'associe. En effet, Kwak *et al.*¹⁸³ ont mis en évidence que l'augmentation du courant I_{Kur} par la PKA avait lieu lorsque le canal hKv1.5 était co-exprimé avec la sous-unité hKv β 1.3 dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, mais non en présence de la sous-unité hKv β 1.2, ni de hKv1.5 seul. Pour ce qui est de la PKC, son effet inhibiteur serait plutôt observé lorsque le canal est en présence de la sous-unité hKv β 1.3 et très minime avec hKv1.5 seul.¹⁸² Ces deux études suggèrent que l'association de hKv1.5 avec différentes sous-unités β dans le cœur soit requise pour une stimulation adrénergique adéquate.¹⁸²

Le courant I_{Kur} peut aussi être modulé par la tyrosine kinase v-Src, qui s'associe, via son domaine SH3, avec un domaine riche en proline dans la région NH₂-terminale du canal hKv1.5.¹⁸⁴ Cette association, qui a été observée autant avec le canal hKv1.5 exprimé dans les myocytes qu'avec le canal cloné, inhibait le courant I_{Kur} sans toutefois diminuer le niveau d'expression de la protéine.¹⁸⁴

Néanmoins, une autre étude a cependant démontré que la phosphorylation de résidus tyrosine jouait un rôle important dans la régulation du niveau d'ARNm codant pour le canal Kv1.5 dans des myocytes cardiaques de rat cultivés à faible densité.¹⁸⁵ L'exposition de ces myocytes à des inhibiteurs de tyrosine kinase (genistein et tyrphostin A25) prévenait la forte diminution du niveau d'ARNm de Kv1.5¹⁸⁵ qu'on remarque habituellement quand les myocytes cardiaques sont cultivés à faible densité.¹⁸⁶ Le même effet a été observé lorsque les myocytes cardiaques ont été co-cultivés avec des cellules exprimant le récepteur RPTP μ (receptor-type protein tyrosine phosphatase μ).¹⁸⁵ Ce dernier est une protéine transmembranaire retrouvée dans le cœur¹⁸⁷ et dont l'expression à la surface des myocytes a été reconnue pour être régulée par des changements dans les contacts de cellule à cellule.¹⁸⁸ Plus précisément, en l'absence de contacts cellulaires, les molécules de RPTP μ nouvellement synthétisées sont rapidement éliminées de la surface de la cellule. Dans le cas contraire, elles s'accumulent dans les régions intercellulaires, ce qui pourrait causer une déphosphorylation des résidus tyrosine des substrats présents aux régions de contacts.¹⁸⁸ Ainsi, selon l'étude de Hershman et Levitan,¹⁸⁵ il semble que RPTP μ régulerait le niveau d'ARNm de Kv1.5 par l'intermédiaire des interactions de

cellule à cellule et qu'il pourrait jouer un rôle important lors de conditions pathologiques associées à une diminution des interactions cellulaires dans le cœur.

2.4.2 Modulation par le pH

Lors d'une ischémie cardiaque, le pH des myocytes peut s'abaisser jusqu'à 5,9.¹⁸⁹ Une étude a démontré que le canal Kv1.5 exprimé chez le rat était bloqué à des pH extracellulaires acides (i.e. 5,3 et 6,3) comparables à ceux qui sont observés lors de cette pathologie.¹⁹⁰ Par exemple, un pH de 5,3 abaissait l'amplitude du courant de plus de 95%. À un pH de 6,3 comparativement au pH physiologique de 7,3, l'amplitude du courant était diminuée presque de moitié et, en présence de dépolarisations prolongées, l'inactivation était largement augmentée. De plus, au pH le plus acide, le temps requis aux canaux pour récupérer de l'état d'inactivation était de beaucoup supérieur. La réduction de l'amplitude du courant suite à de courtes dépolarisations successives était également plus importante au pH de 6,3. L'acidification extracellulaire a aussi causé un décalage de la dépendance au voltage de l'activation vers des voltages plus élevés et augmenté le temps requis pour atteindre une amplitude maximale de courant en réponse à la dépolarisation.¹⁹⁰

Selon Steidl et Yool,¹⁹⁰ le blocage du canal Kv1.5 du rat à pH acide serait attribuable à la protonation du résidu H452 dans la boucle extracellulaire entre le segment transmembranaire S5 et le pore du canal. Il a aussi été proposé, dans une étude faite sur hKv1.5, que la lysine en position 487 (région pore-S6) était impliquée dans l'inhibition du courant par les protons extracellulaires.¹⁹¹ Par exemple, à un pH de 5,9, alors que le canal hKv1.5 sauvage a une conductance maximale relative (g_{max}) moyenne de 0,07, celle de hKv1.5-R487V était de 0,92.¹⁹² La sensibilité de hKv1.5 à un pH acide était également réduite en présence de la mutation H463Q (face externe du pore, la "tourelle"), l'histidine en cette position étant l'homologue du résidu H452 du canal Kv1.5 du rat.¹⁹²

La réduction, à pH acide, du courant produit par le canal Kv1.5 du rat ainsi que la forte augmentation de l'amplitude de l'inactivation lors de dépolarisations prolongées seraient vraisemblablement dues à l'accumulation de canaux en état d'inactivation de type

C,¹⁹⁰ tout comme c'est le cas pour le canal hKv1.5.¹⁹² Il semble que la liaison des ions H⁺ aux résidus H463 de la sous-unité α de hKv1.5 stabiliserait le canal dans un état d'inactivation.¹⁹²

La surface externe des cellules est chargée négativement dû à la présence de groupements phosphate et de chaînes glycosylées. Lors d'une acidification, le nombre de protons augmente considérablement et ceux-ci neutralisent des charges négatives à la surface cellulaire en s'y accolant. Ils repoussent présumément aussi les charges positives (majoritairement constituées d'ions K⁺) présentes à l'intérieur de la cellule par un phénomène capacitif. Dans le cas d'une augmentation de pH, c'est la quantité de charges négatives qui s'accroît (OH⁻), ce qui attire les charges positives vers la face interne de la membrane cellulaire. Ainsi, les variations de pH provoquent des changements graduels du potentiel dans le voisinage immédiat de la surface membranaire, ce qui peut modifier la conformation de certains canaux ioniques dépendants du voltage. Ces gradients de potentiels ont parfois la capacité de faire ouvrir ou fermer des canaux ioniques.^{193, 194}

Par exemple, une étude effectuée sur le canal potassique HERG a mis en évidence qu'un pH extracellulaire de 8,0 décalait la courbe d'activation vers des voltages plus négatifs comparativement à un pH extracellulaire de 7,4.¹⁹⁵ Les auteurs avaient donc pour hypothèse que le canal HERG aurait pu voir le changement de champ électrique induit par une augmentation des charges négatives, à la face interne de la membrane cellulaire, comme étant une dépolarisation de la membrane et qu'il se serait activé à des voltages plus négatifs. Suivant cette logique, les résultats observés à pH acide par Steidl et Yool¹⁹⁰ sur le canal Kv1.5 du rat pourraient aussi être une conséquence du changement de potentiel de surface. Ainsi, la répulsion des charges positives intracellulaires par les protons pourrait avoir causé un retard dans l'ouverture des canaux, d'où le décalage de la courbe d'activation vers des voltages plus positifs et l'inactivation plus prononcée.

Enfin, plusieurs études ont démontré une augmentation de la durée des potentiels d'action auriculaire et ventriculaire lors de l'acidification des myocytes cardiaques.¹⁹⁶⁻²⁰⁰ L'inactivation de Kv1.5 induite à pH acide pourrait réduire le courant I_{Kur} et ainsi prolonger la durée du potentiel d'action.¹⁹⁰

2.4.3 Modulation par les ions

Des travaux effectués il y a quelques années ont suggéré que des sites de liaison à certains ions seraient présents sur les faces interne et externe du pore du canal hKv1.5 et que ceux-ci pourraient réguler l'inactivation et la désactivation.^{167, 201} Fedida *et al.*¹⁶⁷ ont évalué l'effet d'une concentration intracellulaire de 135 mM de différents ions monovalents sur l'inactivation du canal. Ils ont démontré que le Cs⁺ et le Rb⁺ diminuaient l'amplitude de l'inactivation alors que les ions Na⁺ l'augmentaient de façon drastique, par rapport à ce qui est observé avec le K⁺. De plus, l'amplitude de l'inactivation était inversement proportionnelle à la grosseur des cations: la plus faible a été observée en présence du cation le plus volumineux (Cs⁺) et la plus élevée, en présence du plus petit (Na⁺). Les auteurs ont également noté que ces ions monovalents avaient très peu d'effets sur l'inactivation de hKv1.5 lorsqu'ils étaient situés du côté extracellulaire. Ils ont suggéré que ces ions régulaient l'amplitude de l'inactivation par saturation des sites de liaison aux cations dans le pore du canal.¹⁶⁷

L'effet des cations (Cs⁺, Rb⁺, K⁺, Na⁺ et NMG⁺ (*N*-methyl-D-glucamine)) sur la désactivation de hKv1.5 a pour sa part été évalué par Wang *et al.*²⁰¹ à l'aide d'un canal hKv1.5 rendu moins conducteur par l'introduction de la mutation W472F dans le pore. Le canal muté produit alors des courants transitoires brefs, mais sa dépendance au voltage est très semblable à celle du canal sauvage.²⁰² Les résultats ont démontré que du côté intracellulaire (130 mM), c'est en présence du Cs⁺ que la désactivation a été la plus rapide, suivi, en ordre décroissant, des ions Rb⁺, K⁺, Na⁺ et NMG⁺. Au niveau extracellulaire, c'est encore avec les ions Cs⁺ que les auteurs ont noté la désactivation la plus rapide, suivi des ions Rb⁺ et Na⁺. Les ions NMG⁺ avaient quant à eux un effet semblable aux ions Na⁺. Ainsi, ce sont les cations intracellulaires qui sont les plus efficaces pour réguler la vitesse de la désactivation et les plus gros provoquent la désactivation la plus rapide chez hKv1.5.²⁰¹

Les cations divalents sont eux aussi bien connus pour modifier les propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques.²⁰³ Le canal Kv1.5 est particulièrement sensible à différentes concentrations extracellulaires des ions zinc (Zn²⁺) et nickel (Ni²⁺). Par

exemple, il a été démontré qu'une concentration extracellulaire de 1 mM de Zn^{2+} ralentit et accélère respectivement les cinétiques d'activation et de désactivation du canal, en plus de diminuer l'amplitude du courant d'une façon dépendante de la concentration et indépendante du voltage. Ainsi, les ions Zn^{2+} produiraient à la fois un changement des propriétés électrophysiologiques et un blocage du canal hKv1.5. Il a été proposé que, lorsque présents dans le milieu extracellulaire, les ions Zn^{2+} se fixeraient au pore lorsqu'il est à l'état fermé et réduiraient la sensibilité du canal au voltage tout en diminuant les mouvements de charges conduisant à l'activation.²⁰³ De plus, la présence d'ions K^+ et Cs^+ extracellulaires supprime le blocage de hKv1.5 induit par les ions Zn^{2+} tout en n'ayant aucun effet sur les changements qu'ils provoquent aux propriétés d'activation. Les effets du Zn^{2+} sur hKv1.5 semblent donc être attribuables à la présence de deux sites de liaison distincts.²⁰⁴ Les acides aminés H463 et R487, situés dans la "tourelle" et près de l'entrée du pore, semblent être impliqués dans les effets des ions Zn^{2+} sur le canal hKv1.5.¹⁹² En effet, l'inhibition du courant provoquée par ces ions serait substantiellement réduite par la présence des mutations H463Q et R487V. Tout comme le fait la protonation des résidus H463, la liaison des ions Zn^{2+} à ces derniers stabiliserait possiblement le canal hKv1.5 dans un état inactivé.¹⁹²

Les ions Ni^{2+} extracellulaires bloquent eux aussi le canal hKv1.5 d'une façon dépendante de la concentration, mais contrairement au Zn^{2+} , ils ne changent pas les propriétés électrophysiologiques. De plus, ce blocage est réversible, indépendant du voltage et dépendant de la fréquence de stimulation.²⁰⁵ En effet, Perchenet et Clément-Chomienne²⁰⁵ ont noté que l'amplitude du courant en présence de Ni^{2+} était de plus en plus réduite pour des fréquences de 0,02, 0,2 et 2 Hz. Ils ont aussi remarqué que plus le temps d'incubation des canaux en présence des ions Ni^{2+} était prolongé avant l'application d'un voltage de dépolarisation, plus le blocage était prononcé. Par ailleurs, le degré d'inhibition du courant était directement proportionnel à la durée des épisodes de dépolarisation imposés aux cellules.²⁰⁵ Ces résultats indiquent que les ions Ni^{2+} interagissent avec le canal hKv1.5 lorsqu'il est dans un état non conducteur (i.e. au repos ou inactivé).²⁰⁵ Une étude récente a démontré qu'une augmentation de la concentration extracellulaire de K^+ ainsi que la présence des mutations H463Q et R487V inhibent le blocage du canal hKv1.5 par le Ni^{2+} .²⁰⁶ Il semble que, comme le font les protons, les ions Ni^{2+} se lieraient aux résidus

H463 de la sous-unité α , ce qui provoquerait l'inactivation du canal. Ce processus d'inactivation impliquerait également le résidu R487.²⁰⁶

Enfin, il a aussi été démontré, récemment, qu'une concentration intracellulaire de 10 mM de Mg^{2+} diminue l'amplitude du courant produit par Kv1.5 d'une façon dépendante du voltage tout en accélérant les cinétiques d'activation et d'inactivation.²⁰⁷

2.4.4 Modulation par les espèces réactives de l'oxygène

Une étude récente a démontré que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), à des concentrations pathophysiologiques (20 à 1000 μM), accélérât les cinétiques d'activation du canal hKv1.5 exprimé dans des cellules CHO et qu'il provoquait également un décalage de la courbe d'activation vers des voltages plus négatifs.¹⁴⁸ Ce décalage était toutefois dépendant du voltage, puisque l'amplitude du courant était augmentée à des voltages inférieurs à +20 mV et diminuée à des voltages de plus fortes dépolarisations.¹⁴⁸ En bref, il a été démontré que le H_2O_2 augmente l'amplitude du courant à des voltages correspondant à la phase de repolarisation du potentiel d'action.¹⁴⁸ Le H_2O_2 n'est pas, par définition, un radical libre de l'oxygène, mais il est tout de même un oxydant important. La modulation du canal hKv1.5 par le H_2O_2 pourrait être attribuable à l'oxydation de ses résidus cystéine, mais aussi aux cascades de signaux intracellulaires.¹⁴⁸ En effet, il est connu que le H_2O_2 réprime l'activité de l'adénylyl cyclase²⁰⁸ et que Kv1.5 est régulé par la PKA,^{183, 209} tel que mentionné plus haut.

Une autre étude rapporte que le canal Kv1.5 de la souris, exprimé dans des ovocytes de *Xenopus*, était inhibé de façon drastique à des voltages élevés par le rose de bengale, un générateur classique d'espèces réactives de l'oxygène.²¹⁰

2.4.5 Modulation par les androgènes

Il y a quelques années, une étude a démontré que l'intervalle QT ainsi que la durée du potentiel d'action ventriculaire de la souris (espèce CD-1) étaient plus longs chez la femelle que chez le mâle, et que la densité du courant I_{Kur} de même que le niveau d'expression du canal Kv1.5 étaient largement supérieurs chez la souris mâle.²¹¹ Des résultats similaires ont par la suite été mis en évidence chez un groupe de souris CD-1 castrées à l'âge de 37 jours (i.e. juste avant d'atteindre la maturité sexuelle) comparativement à un groupe de souris mâles contrôles.²¹²

Par ailleurs, une autre étude a comparé des souris des espèces CD-1 et C57BL/6, dont les niveaux de testostérone sont respectivement normaux et très bas. Cette étude a révélé que la densité du courant I_{Kur} était beaucoup plus grande chez les mâles de l'espèce CD-1 que chez les femelles, mais qu'aucune différence n'était observée entre les sexes chez l'espèce C57BL/6.²¹³ En administrant de la dihydrotestostérone (DHT, un dérivé de la testostérone qui ne peut pas être transformé en oestrogènes) aux souris mâles de l'espèce C57BL/6, les auteurs ont remarqué une hausse importante de la densité du courant I_{Kur} et du niveau d'expression de Kv1.5. Ils ont noté les mêmes observations chez un groupe de souris CD-1 castrées et traitées à la DHT. Enfin, l'administration de cette hormone aux souris C57BL/6 mâles diminuait la durée du potentiel d'action ainsi que l'intervalle QT. Cette étude semble donc démontrer que les hormones sexuelles mâles (androgènes) régulent la repolarisation cardiaque et que la testostérone augmente la densité du courant I_{Kur} de même que le niveau d'expression de Kv1.5.²¹³

Les récepteurs des androgènes sont exprimés dans le cœur²¹⁴ et la liaison d'un androgène à son récepteur résulte en la formation d'un complexe actif qui se lie à l'ADN et qui rehausse la transcription de gènes spécifiques.²¹⁵ De plus, une grande partie de l'élément ARE (androgen response element), soit 14 nucléotides consécutifs sur 15, est présente dans la région flanquant l'extrémité 5' du gène *Kv1.5* de la souris.²¹⁶ Ceci indique que le canal Kv1.5 pourrait vraisemblablement être régulé par les androgènes, comme les études mentionnées précédemment semblent le démontrer.

2.4.6 Modulation de l'expression de surface

Le bon fonctionnement des canaux ioniques implique qu'ils soient assemblés correctement, qu'ils aient la structure qui leur est propre et que leur expression à la surface de la cellule soit adéquate. Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation de canaux ioniques fonctionnels. Brièvement, la biosynthèse des canaux potassiques de type Shaker, par exemple, débute dans le réticulum endoplasmique, où ils sont simultanément synthétisés et oligomérisés sous forme de tétramères.²¹⁷ Ils sont ensuite transportés vers l'appareil de Golgi, puis vers la surface cellulaire.²¹⁸ Ainsi, leur processus de formation étant complexe, de nombreux facteurs peuvent influencer leur niveau d'expression.

Tout d'abord, il a été démontré que le pore et les régions COOH- et NH₂-terminales de certains canaux ioniques pouvaient moduler leur expression à la surface cellulaire. Il semble en effet que les acides aminés 504 à 511 et 533 à 537 du pore²¹⁹ de même que le motif VXXSL de l'extrémité COOH-terminale du canal Kv1.4²²⁰ soient impliqués dans sa forte expression de surface. Dans le cas de Kv1.5, une étude récente a mis en évidence que certains acides aminés de la région NH₂-terminale auraient une telle fonction.²²¹ Cette étude a démontré que le niveau d'expression de surface du canal Kv1.5 du rat, dans une lignée de cellules HEK293 transfectée comme dans des myocytes auriculaires, était modulé par une interaction avec le complexe dyneine-dynactine. Celui-ci est impliqué dans le transport des endosomes de la surface vers l'intérieur de la cellule²²² et son inhibition augmenterait le niveau d'expression de Kv1.5 par un blocage de l'endocytose et une redistribution des canaux à la surface cellulaire. La délétion des acides aminés 65 à 93 aurait cependant éliminé l'effet modulateur du complexe dyneine-dynactine.²²¹ La région délétée est riche en proline et possède deux sites consensus SH3 (RPLPPLP) de liaison à la tyrosine kinase *src*.²²³ En introduisant des mutations uniquement dans le deuxième site (RPLAALP) sur la protéine pleine longueur, Choi *et al.*²²¹ ont obtenu les mêmes résultats qu'avec le canal délété. Ainsi, il semble que la phosphorylation de résidus tyrosine sur le canal Kv1.5, qui est d'ailleurs reconnue pour diminuer l'amplitude du courant,¹⁸⁴ est nécessaire à l'action du complexe dyneine-dynactine.²²¹

La protéine SAP97 est un autre régulateur de l'expression de surface de Kv1.5 et elle est retrouvée en abondance dans le cœur.²²⁴ Elle s'associe, via son domaine PDZ [pour PSD95 (post synaptic density protein),DlgA (Drosophila disc large tumor suppressor) et ZO1 (protéine jonctionnelle de mammifère)]; les domaines PDZ sont des structures globulaires de 80 à 90 acides aminés presque toujours retrouvées dans des protéines cytoplasmiques], à une séquence particulière (xS/TxV) de la région COOH-terminale de plusieurs canaux potassiques de type Shaker avant qu'ils ne soient ancrés dans la membrane, ce qui module leur transport vers la surface de la cellule.^{225, 226} Par exemple, la protéine SAP97 diminue l'expression de surface de Kv1.4.²²⁵ Par contre, lorsque SAP97 est co-exprimée avec le canal Kv1.5, le courant qu'il produit est largement augmenté.^{178, 227, 228} Il semble néanmoins que cette protéine agit sur Kv1.5 de façon indirecte et qu'elle nécessite une région NH₂-terminale intacte. De fait, une étude a démontré que la protéine SAP97, co-exprimée avec Kv1.5 dans une lignée de cellules HEK293, faisait augmenter la densité du courant mais ne co-précipitait pas avec le canal. De plus, elle n'avait aucun effet sur Kv1.5ΔN209.¹⁷⁸ Récemment, une autre étude a rapporté que l'action de SAP97 serait étroitement liée au résidu thréonine en position 15 du segment NH₂-terminal du canal, qui fait partie d'un site de phosphorylation par la PKC. Le remplacement de cette thréonine par une alanine a complètement aboli l'effet de la protéine SAP97 sur le niveau d'expression de surface de Kv1.5. Le même résultat a été obtenu en présence du canal sauvage suite à l'inhibition de la PKC par la calphostine C, ce qui suggère que cette kinase serait impliquée dans l'action de SAP97 sur l'expression de Kv1.5.²²⁸

Le niveau d'expression de surface de Kv1.5 est également modulé par l'action de la protéine accessoire KCHIP2 (Kv channel interacting protein 2),¹⁷⁹ qui est elle aussi exprimée abondamment dans le cœur.²²⁹ Il a en effet été démontré que cette protéine s'associait avec le canal Kv1.5 de la souris, dans des cellules HEK293, diminuant largement la densité du courant sans toutefois modifier les propriétés électrophysiologiques du canal. Par ailleurs, des analyses d'immunohistochimie faites sur ces cellules ont démontré que le complexe Kv1.5-KCHIP2 était retrouvé plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, KCHIP2 pourrait diminuer l'expression de Kv1.5 à la surface cellulaire en bloquant son transport du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.¹⁷⁹

Ensuite, certaines études ont rapporté que les sous-unités β pouvaient elles aussi moduler le transport des canaux potassiques, bien qu'aucune d'elles ne porte sur Kv1.5. Il semble en fait que l'interaction de la sous-unité β avec les sous-unités α aurait lieu dès le début de la biosynthèse, ce qui favoriserait leur transport vers la surface de la cellule. C'est le cas notamment du canal Kv1.2 cardiaque du rat, par exemple, pour lequel certains travaux ont démontré qu'il s'associait à Kv β 2 (la principale sous-unité β exprimée au cerveau) dans le réticulum endoplasmique lors d'une co-expression dans une lignée de cellules COS1.²³⁰ La sous-unité Kv β 2 aurait alors vraisemblablement un rôle de chaperone, favorisant entre autre la N-glycosylation et la stabilité du canal en plus d'augmenter son niveau d'expression à la surface de la cellule.²³⁰ La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle reconnue pour favoriser un assemblage adéquat et une plus grande stabilité de nombreux canaux potassiques tout en optimisant leur transport vers la membrane cellulaire.²³¹

Quelques études supplémentaires ont elles aussi démontré un rôle de chaperone pour d'autres sous-unités β . Par exemple, des auteurs ont mis en évidence que l'interaction de mKv β 4 avec le canal Kv2.2 dans le cerveau de la souris augmentait considérablement l'expression de ce dernier à la surface cellulaire.¹⁷⁷ Des résultats semblables ont été observés avec les sous-unités Kv β 1.1 et Kv β 2.1 en présence du canal Kv4.3 du cerveau du rat.²³² Enfin, récemment, des auteurs ont remarqué que les densités des courants produits par les canaux potassiques Kv2.1 et Kv4.3 étaient respectivement augmentées et diminuées dans des myocytes ventriculaires d'une espèce de souris sur laquelle le gène Kv β 1 (codant pour les sous-unités mKv β 1.1, -1.2 et -1.3) avait été inactivé.²³³

Tout comme les sous-unités β , il semble que le domaine de tétramérisation (T1) des canaux potassiques dépendants du voltage servirait lui aussi de chaperone lors de leur biosynthèse. Il se forme très tôt, alors même que le canal est encore attaché à la membrane du réticulum endoplasmique.^{234, 235} Il est impliqué dans la stabilisation du canal et il régule son expression à la surface de la cellule.²³⁶

2.5 Modulation pharmacologique du canal hKv1.5

L'activité du canal hKv1.5 est influencée par plusieurs médicaments, dont certains antiarythmiques des classes I, III et IV. Ces derniers modulent également d'autres canaux ioniques. Il est en effet assez rare que les médicaments aient une action dirigée contre une seule protéine cible. Par contre, d'autres agents découverts au cours des dernières années semblent cependant agir plus spécifiquement sur hKv1.5 et des études cliniques ont démontré qu'ils pourraient potentiellement être utilisés pour traiter les arythmies de l'oreillette. Enfin, d'autres études ont démontré que le canal potassique hKv1.5 pouvait aussi être affecté par l'action de médicaments utilisés notamment pour le traitement des maladies de Parkinson et de Huntington.

2.5.1 Anti-arythmiques de classe I

Selon la classification de Vaughan-Williams, les antiarythmiques de classe I sont divisés en trois groupes, soient IA, IB et IC. Ce sont tous des inhibiteurs de canaux sodiques, mais ceux des classes IA et IC ont respectivement pour particularité additionnelle de prolonger l'intervalle QT et de diminuer la vitesse de conduction.²³⁷ De ceux-ci, par exemple, il est connu que la quinidine (classe IA) et la propafenone (classe IC) inhibent le canal Kv1.5 en plus des canaux sodiques.²³⁸ La flecainide, un autre agent antiarythmique de la classe IC, a aussi un effet inhibiteur sur le courant I_{Kur} , mais seulement chez certaines espèces. En effet, des travaux ont démontré que cet agent inhibe le courant I_{Kur} du chien²³⁹ mais pas celui de l'humain.²⁴⁰

2.5.2 Anti-arythmiques de classe III

Ces molécules bloquent les canaux potassiques de façon à prolonger la repolarisation ainsi que la durée de la période réfractaire.^{237, 241} Plusieurs d'entre elles peuvent provoquer des arythmies ventriculaires, comme c'est le cas du sotalol et du dofetilide, par exemple.²⁴²⁻²⁴⁴ Les antiarythmiques de classe III sont par ailleurs dirigés

principalement contre le courant I_{Kr} ,²⁴⁵ mais certains d'entre eux peuvent également bloquer I_{Kur} ainsi que d'autres courants. Le tedisamil, qui inhibe plusieurs canaux potassiques,²⁴⁶ en est un exemple. En plus de bloquer I_{Kr} et I_{Ks} , il agit également contre I_{to} , I_{KATP} et I_{Kur} . À titre démonstratif, une concentration de 1 μM de tedisamil inhibe le courant I_{Kr} de plus de 70%, mais a beaucoup moins d'effet sur les autres courants. Cependant, aucune donnée quantitative n'a été rapportée au sujet d' I_{Kur} .²⁴⁷

2.5.3 Antiarythmiques de classe IV

Les anti-arythmiques de classe IV inhibent plus particulièrement les canaux calciques.²³⁷ Il a toutefois été démontré que certains agents de cette catégorie, tels le diltiazem, le verapamil et la nifedipine, pouvaient également diminuer l'amplitude du courant produit par le canal hKv1.5. Une étude récente a démontré que le diltiazem inhibe le canal hKv1.5 d'une façon dépendante de la fréquence de stimulation (de 11,7, 21,3 et 24,3% respectivement à 1, 2 et 5 Hz, en présence de 10 nM de diltiazem). Cet antiarythmique de classe IV interagit avec hKv1.5 lorsque ce dernier est à l'état ouvert ou inactivé. Par ailleurs, la courbe concentration-réponse du canal hKv1.5 pour le diltiazem est biphasique, les IC_{50} étant de 4,8 nM et 42,3 μM .²⁴⁸ Le diltiazem a possiblement plus d'affinité pour l'état ouvert ou inactivé de hKv1.5, ce qui pourrait expliquer l'allure biphasique de la courbe dose-réponse. Pour ce qui est du verapamil et de la nifedipine, ils inhibent le canal hKv1.5 à l'état ouvert et les IC_{50} sont respectivement de 20 et 6,3 μM .^{249,250}

2.5.4 Molécules dirigées plus spécifiquement contre hKv1.5

Plusieurs équipes de recherche ont pour objectif d'améliorer le traitement pharmacologique de la fibrillation auriculaire (une forme d'arythmie affectant l'activité électrique de l'oreillette) en tentant d'identifier des molécules qui corrigeraient les symptômes de cette maladie sans affecter le fonctionnement des ventricules. L'intérêt est

donc de mettre sur le marché des médicaments qui auraient une action spécifique aux oreillettes. Étant donné que le courant I_{Kur} n'est exprimé que dans celles-ci,¹⁴⁶ beaucoup d'efforts sont consacrés à trouver des agents qui inhibent le canal hKv1.5 préférentiellement aux autres canaux potassiques et qui pourraient éventuellement être utilisés comme antiarythmiques de classe III. L'essentiel de la littérature sur la modulation pharmacologique du courant I_{Kur} porte d'ailleurs sur ce sujet.

Au cours des dernières années, des études ont démontré que des molécules comme l'AVE0118, le S9947, le S20951, le NIP-142, l'AZD7009 et le DPO-1, par exemple, semblaient inhiber ce courant de façon plus spécifique que les anti-arythmiques connus. Tout d'abord, l'AVE0118 est un composé de type bisaryl dont l'action inhibitrice est dix fois plus prononcée pour le canal hKv1.5 que pour HERG (IC₅₀ de 1,1 par rapport à 10 µM dans des cellules CHO).²⁵¹ Il a aussi été démontré qu'il prolongeait significativement la période réfractaire efficace dans l'oreillette de cochon (espèce German Landrace) sans affecter l'intervalle QT,²⁵² tout comme le font les biphényles S9947 et S20951.²⁵³ Des résultats similaires ont également été observés avec le NIP-142 chez le chien.²⁵⁴ Ce dernier est un composé de type chromane.²³⁸ L'IC₅₀ du courant I_{Kur} pour le S9947, mesuré dans des myocytes humains, est de 0,7 µM.²⁴⁵ Par ailleurs, l'IC₅₀ de hKv1.5 a été évalué à 1,2 µM pour le S20951 dans des ovocytes de *Xenopus*²³⁸ et à 4,75 µM pour le NIP-142 dans des cellules HEK293.²⁵⁵

Pour ce qui est de l'AZD7009, il bloque les courants I_{Kr} (produit par HERG) et I_{Kur} en plus de I_{Na} . C'est un médicament qui est présentement en essais cliniques de phase II et qui semble être très efficace pour le traitement de la fibrillation auriculaire. En effet, une étude effectuée chez le chien a démontré que l'AZD7009 prolongeait la période réfractaire de façon deux fois plus importante dans l'oreillette que dans le ventricule (33% versus 17%) et qu'il n'avait pas d'effet significatif sur l'intervalle QT.²⁵⁶

Enfin, tout comme les autres composés chimiques mentionnés dans la présente section, le DPO-1, un oxyde de diphénylphosphine, augmente spécifiquement la période réfractaire de l'oreillette tel que l'a démontré une étude faite chez le chien.²⁵⁷ De plus, des travaux récents ont mis en évidence que dans des cellules CHO, ce composé inhibe le canal hKv1.5 d'une façon dépendante de la fréquence de stimulation (IC₅₀ de 0,16, 0,05 et 0,03

μM à des fréquences respectives de 0,1, 1,0 et 3,0 Hz). Dans des myocytes auriculaires humains, les valeurs d' IC_{50} du courant I_{Kur} pour le DPO-1, à ces mêmes fréquences, sont de 0,08, 0,04 et 0,03 μM .²⁵⁸ Il semble par ailleurs que ce composé est beaucoup plus sélectif à I_{Kur} qu'à d'autres courants ioniques. En effet, une concentration de 3 μM de DPO-1 mise en présence de myocytes ventriculaires de cochon d'Inde a bloqué les courants I_{K1} , I_{Kr} et I_{Ks} de seulement 15, 3 et 25% respectivement et 1 μM de cet oxyde de diphénylphosphine n'a eu aucun effet sur I_{to} dans des myocytes auriculaires humains.²⁵⁸ Ces résultats indiquent que le DPO-1 pourrait éventuellement être utilisé pour un traitement plus efficace des arythmies auriculaires.

2.5.5 Autres agents pharmacologiques modulant le canal hKv1.5

Enfin, outre certains antiarythmiques classiques et les composés identifiés récemment comme ayant une spécificité accrue pour $I_{Kur}/\text{Kv}1.5$, il existe aussi d'autres agents pharmacologiques qui ont une action inhibitrice sur ces derniers. De ceux-ci, par exemple, notons la cibenzoline, l'oxypeucedanine, le riluzole et le pergolide. La cibenzoline est un antiarythmique, mais elle appartient à la fois aux classes Ia et III. C'est un imidazole qui bloque plusieurs canaux sodiques, calciques et potassiques et qui traite la fibrillation auriculaire paroxystique (i.e. qui se termine spontanément) de façon très efficace.^{259, 260} Un pré-traitement à la cibenzoline chez des rats ayant subi des stimulations rapides de l'oreillette afin de provoquer cette pathologie a diminué de façon significative l'augmentation des niveaux d'ARNm de Kv1.5 qui est habituellement observée dans cette condition.²⁶¹

L'oxypeucedanine, pour sa part, est un dérivé du furocoumarin extrait de l'herbe *Angelica dahurica*. On l'utilise par exemple pour traiter des problèmes menstruels et pour soulager les maux de tête.²⁶² L' IC_{50} sur hKv1.5 exprimé dans des cellules *Ltk* a été évaluée à 76 nM pour l'oxypeucedanine, qui n'a par ailleurs aucun effet inhibiteur sur le canal HERG.²⁶³ Dans le cas du riluzole (un neuroprotecteur), son action inhibitrice a été testée sur le canal Kv1.5 du cerveau du rat exprimé dans des cellules CHO, l' IC_{50} ayant été évaluée à près de 40 μM .²⁶⁴ Pour ce qui est du pergolide, un médicament employé pour

traiter la maladie de Parkinson par stimulation des récepteurs de la dopamine,²⁶⁵ une étude récente a démontré qu'il bloque le courant produit par le canal hKv1.5 exprimé dans des cellules CHO, bien que l'IC₅₀ n'ait pas été calculée.²⁶⁶

Enfin, il a aussi été démontré que les cytochalasines A et B, des métabolites fongiques qui détruisent les filaments d'actine,^{267, 268} inhibent le courant produit par le canal hKv1.5 dans une lignée de cellules *Ltk* (IC₅₀ de 1,4 et 4,2 µM respectivement). Une concentration de 10 µM de cytochalasine B bloque aussi le courant I_{Kur} d'environ 70% dans les myocytes auriculaires humains.²⁶⁹

2.6 Les "channelopathies"

Le terme "channelopathies" réfère à des maladies qui sont causées par des mutations dans des gènes codant pour des canaux ioniques. Les principales maladies cardiaques pouvant être causées par de telles mutations sont listées au tableau III. Elles incluent plusieurs types des syndromes du QT long (LQTS) et du QT court (SQTS), le syndrome de Brugada, la fibrillation ventriculaire idiopathique, la tachycardie ventriculaire catécholaminergique ou polymorphe, le trouble de conduction cardiaque, la cardiomyopathie, le "sick sinus syndrome" et la fibrillation auriculaire. La figure 12 présente des exemples d'ECG illustrant les manifestations cliniques de certaines "channelopathies" cardiaques.

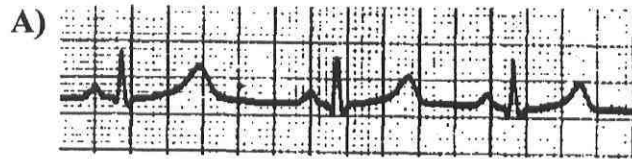
Tableau III. Liste des principales channelopathies cardiaques montrant la cause de chacune d'elles ainsi que les gènes défectueux qui y sont associés et leur position sur le chromosome. Adapté de Delisle *et al.*²⁷⁰ et Corrado *et al.*²⁷¹

Channelopathie	Cause	Gène défectueux	Chromosome
QT long: Romano-Ward (LQT1-6), syndrome d'Anderson (LQT7), syndrome de Timothy (LQT8)			
LQT1	I_{Ks} , ↓ amplitude	<i>KvLQT1 (KCNQ1)</i>	11p15.5
LQT2	I_{Kr} , ↓ amplitude	<i>HERG (KCNH2)</i>	7q35-36
LQT3	I_{Na} , ↑ courant tardif	<i>SCN5a (hNav1.5)</i>	3p21-24
LQT4	$[Ca^{2+}]_i$ altérée	<i>ANKB</i>	4q25-27
LQT5	I_{Ks} , ↓ amplitude	<i>MinK (KCNE1)</i>	21q22.1-22.2
LQT6	I_{Kr} , ↑ désactivation	<i>MiRP1 (KCNE2)</i>	21q22.1-22.2
LQT7	I_{K1} , ↓ amplitude	<i>Kir2.1 (KCNJ2)</i>	17q23
LQT8*	$I_{Ca,L}$, non inactivé	<i>CACNA1c</i>	12p13.3
QT long: Jervell et Lange-Nielsen			
JLN1	I_{Ks} , ↓ amplitude	<i>KvLQT1 (KCNQ1)</i>	11p15.5
JLN2	I_{Ks} , ↓ amplitude	<i>MinK (KCNE1)</i>	21q22.1-22.2
Mort subite du nouveau-né			
LQTS (nouveau-né)	I_{Na} , ↑ courant tardif	<i>SCN5a (hNav1.5)</i>	3p21-24
	I_{Ks} , ↓ amplitude	<i>KvLQT1 (KCNQ1)</i>	11p15.5
	I_{Kr} , ↓ amplitude	<i>HERG (KCNH2)</i>	7q35-36
Syndrome du QT court			
SQT1	I_{Kr} , ↑ amplitude	<i>HERG (KCNH2)</i>	7q35-36
SQT2	I_{Ks} , ↑ amplitude	<i>KvLQT1 (KCNQ1)</i>	11p15.5
SQT3**	I_{K1} , ↑ amplitude	<i>Kir2.1 (KCNJ2)</i>	17q23
Syndrome de Brugada			
BS1	I_{Na} , ↓ amplitude	<i>SCN5a (hNav1.5)</i>	3p21-24
BS2	?	?	3p22-25
Fibrillation ventriculaire idiopathique			
IVF	I_{Na} , ↓ amplitude	<i>SCN5a (hNav1.5)</i>	3p21-24

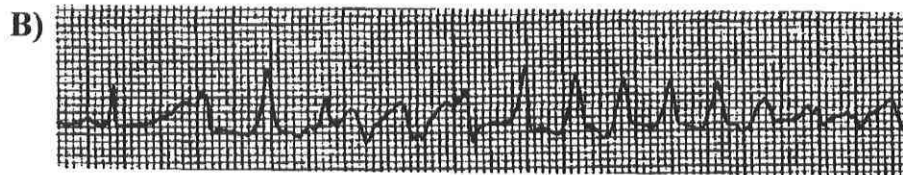
Tableau III (suite):

Channelopathie	Cause	Gène défectueux	Chromosome
Tachycardie ventriculaire			
polymorphe			
CPVT1	$\uparrow [Ca^{2+}]_i$	<i>hRyR2</i>	1q42-43
CPVT2	$\uparrow [Ca^{2+}]_i$	<i>CASQ2</i>	1p13-21
Trouble de conduction cardiaque			
CCD	I_{Na} , \downarrow amplitude	<i>SCN5a (hNav1.5)</i>	3p21-24
Syndrome du sinus malade			
	I_{Na} , \downarrow amplitude	<i>SCN5a (hNav1.5)</i>	3p21-24
	I_f , \downarrow réponse à l'AMPc	<i>HCN4</i>	15q24-25
Fibrillation auriculaire			
	I_{Ks} , \uparrow amplitude	<i>KvLQT1 (KCNQ1)</i>	11p15.5
	I_{K1} , \uparrow amplitude	<i>Kir2.1 (KCNJ2)</i>	17q23
	$I_{Backgrounds}$, \uparrow amplitude	<i>MiRP1 (KCNE2)</i>	21q22

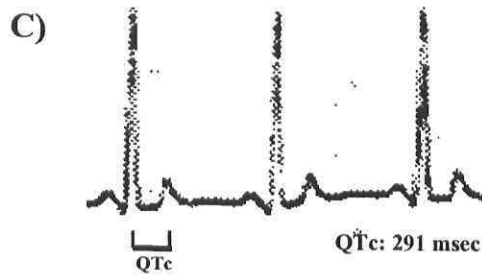
*²⁷²**²⁷³



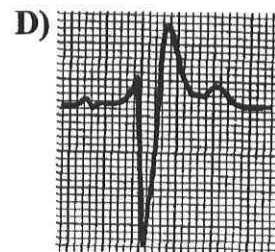
Syndrôme du QT long



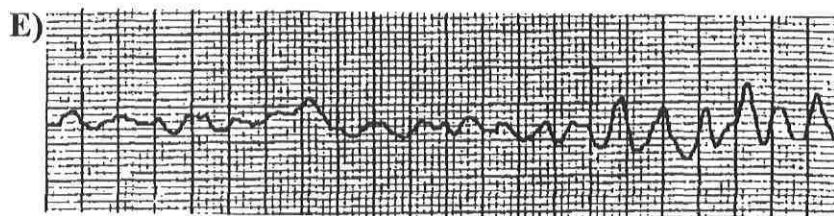
Torsades de pointes



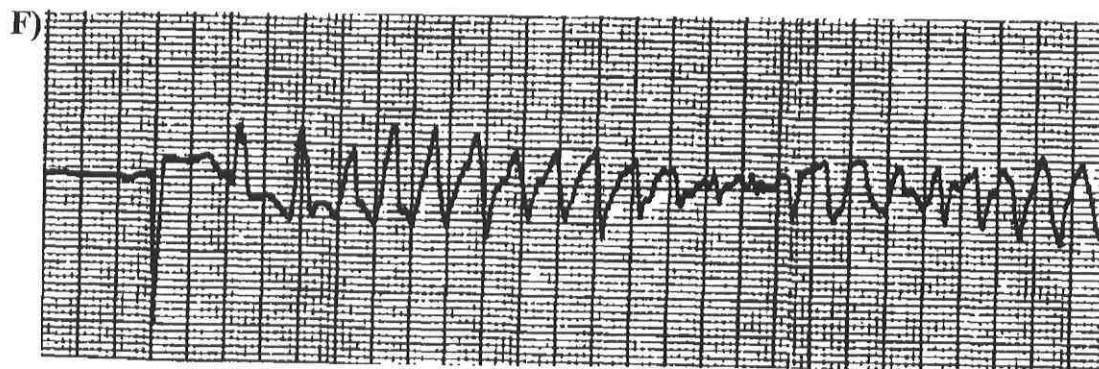
Syndrôme du QT court



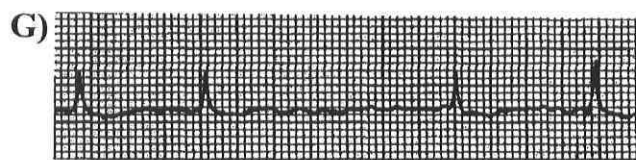
Syndrôme de Brugada



Fibrillation ventriculaire



Tachycardie ventriculaire polymorphe



Fibrillation auriculaire

400 msec

Le LQTS est multigénique. En effet, 90% des patients génotypés pour cette maladie sont porteurs de mutations sur au moins deux des gènes ayant été associés à la maladie.²⁷⁶ Par ailleurs, les gènes en cause ont été identifiés chez seulement 50% à 70% des personnes souffrant du LQTS.²⁷⁶⁻²⁷⁸ Ce syndrome se caractérise par une repolarisation ventriculaire prolongée menant à de graves arythmies telles les torsades de pointes et la fibrillation ventriculaire (voir plus loin), qui peuvent causer la mort subite.²⁷¹ Sur l'ECG des patients atteints, on remarque un intervalle QTc supérieur à 470 msec²⁷⁹ (Figure 12A). Ce dernier est l'intervalle QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque selon la formule de Framingham, soit: $QTc = QT + 0,154 (1-RR)$,²⁸⁰ où RR correspond au temps écoulé entre deux ondes R consécutives. Dans certains cas, on note également une onde U assez prononcée sur l'ECG des personnes atteintes de LQTS.²⁷⁹ En fait, chez ces patients, la repolarisation ventriculaire est tellement prolongée qu'elle est interrompue par des dépolarisations précoces, d'où l'émergence d'arythmies ventriculaires. Par exemple, un intervalle QT supérieur à 500 msec est interrompu par un complexe QRS prématuré qui apparaît au niveau de l'onde T et il s'ensuit alors une série de battements ventriculaires totalement désordonnés qui ont l'allure d'une courbe sinusale sur l'ECG. C'est ce qu'on appelle les torsades de pointes (Figure 12B), qui peuvent elles-mêmes dégénérer en fibrillation ventriculaire. Cette dernière se définit comme étant des contractions rapides, multifocales et inefficaces des ventricules.¹ Le LQTS a été découvert il y a plus de 40 ans et c'est la channelopathie la mieux connue. À l'époque, on y distinguait deux phénotypes cliniques, c'est-à-dire les syndromes de Romano-Ward et de Jervell et Lange-Nielson, d'après les noms de ceux qui les ont identifiés.²⁸¹⁻²⁸³

Le phénotype de Romano-Ward inclut six formes de LQTS identifiées de 1 à 6. Les formes LQT1, 2, 5 et 6 prolongent la phase de plateau du potentiel d'action cardiaque en réduisant les courants potassiques repolarisateurs. Les formes LQT1 et LQT5 sont causées par des mutations dans les gènes *KvLQT1* et *MinK*,^{284, 285} qui codent respectivement pour les sous-unités α et β du canal potassique responsable du courant I_{Ks} . Les types LQT2 et LQT6 sont attribuables à des mutations dans les gènes des sous-unités α et β du canal produisant le courant I_{Kr} (*HERG* et *MiRP1*).^{286, 287} Le LQT3, quant à lui, est dû à des altérations dans le gène *SCN5a* du canal sodique hNav1.5 qui diminuent l'inactivation, causant une augmentation du courant I_{Na} tardif ainsi qu'une prolongation de la phase de

repolarisation précoce (phase 1)²⁷¹ et de la durée du potentiel d'action.²⁸⁸ Plusieurs mutations retrouvées dans les locus associés aux formes 1 à 3 du LQTS (11p15.5, 7q35-36 et 3p21-24 respectivement) ont aussi été mises en cause chez des nouveau-nés atteints du syndrome de la mort subite, qu'on appelle aussi le LQTS du nouveau-né.²⁸⁹⁻²⁹¹ Enfin, pour ce qui est du LQT4, il a été associé à des anomalies dans la protéine ankyrine-B menant à la formation de complexes de signalisation macromoléculaires, qui altèrent les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} tout en réduisant les courants de repolarisation.^{292, 293}

Le phénotype de Jervell et Lange-Nielsen est la forme récessive du LQTS,²⁸³ qui est associée à des mutations homozygotes ou hétérozygotes dans les gènes *KvLQT1* et *MinK*, qui réduisent l'amplitude du courant I_{Ks} .^{294, 295} Des mutations hétérozygotes sur ces mêmes gènes sont responsables de variants alléliques de LQTS du phénotype Romano-Ward (LQT1 et LQT5).²⁹⁶

Deux autres formes de LQTS sont également connues. Il s'agit des syndromes d'Andersen et de Timothy, aussi appelés LQT7 et LQT8 respectivement. Le syndrome d'Andersen est attribuable à des mutations dans le gène *Kir2.1* qui réduisent le courant I_{K1} , ce qui ralentit le retour de la membrane cellulaire vers le potentiel de repos.²⁹⁷ Pour ce qui est du syndrome de Timothy, c'est la forme la plus létale de LQTS. Ce syndrome est caractérisé par une repolarisation ventriculaire prolongée associée à plusieurs autres anomalies telles que l'autisme, un retard de développement du langage, de l'hypoglycémie paroxystique, une réponse immunitaire altérée et des malformations cardiaques.^{272, 296} Actuellement, la mutation G406R dans le canal calcique $Ca_v1.2$, codé par le gène *CACNA1c*, est la seule qui a été associée à ce syndrome. Cette mutation inhibe presque totalement l'inactivation du canal, ce qui cause une surcharge calcique des cellules.²⁷² Tous les patients reconnus jusqu'à présent comme étant porteurs de cette mutation sont atteints du syndrome de Timothy.²⁹⁶

Enfin, certaines mutations ont également été associées au LQTS chez des nouveau-nés qui sont morts subitement. Tout d'abord, Ackerman *et al.*²⁹⁰ ont fait une analyse du gène *SCN5a* chez 93 nouveau-nés morts subitement. Ils ont identifié la mutation A997S dans l'exon 17 de ce gène chez un nouveau-né âgé de six semaines et la mutation R1826H (exon 28) chez un autre qui avait un mois. Ces deux mutations sont situées dans des

régions hautement conservées du canal sodique et elles n'ont pas été retrouvées chez 400 patients contrôles. Au niveau fonctionnel, les mutants A997S et R1826H augmentent de deux à trois fois l'amplitude du courant tardif.²⁹⁰ Des mutations dans les gènes *KvLQT1* et *HERG*, diminuant respectivement l'amplitude des courants I_{Ks} et I_{Kr} , ont également été associées au LQT1 et au LQT2 ainsi qu'à la mort subite du nouveau-né.²⁹¹

Parmi tous les types de LQTS, les plus répandus sont le LQT1 et le LQT2.²⁷⁰ Par ailleurs, un fait intéressant à remarquer est que les différents types de LQTS se manifestent parfois dans des situations diamétralement opposées les unes des autres. Par exemple, les patients atteints du LQT1 sont sujets à faire des syncopes et des arrêts cardiaques lors de la pratique de sports (particulièrement la natation), alors que ceux qui souffrent du LQT3 sont victimes de mort subite au repos ou pendant leur sommeil. Les sujets atteints du LQT2, pour leur part, sont plus susceptibles d'avoir des symptômes lors d'émotions fortes ou de stimuli sonores.²⁹⁸ La variété de mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans l'apparition du LQTS pourrait expliquer ses différentes manifestations cliniques.²⁹⁹

Le syndrome du QT court (SQTS) est une autre channelopathie cardiaque, qui a récemment été découverte.³⁰⁰ Il est caractérisé par un intervalle QTc inférieur ou égal à 300 msec, conséquemment à une accélération de la repolarisation cardiaque²⁷¹ (Figure 12C). Les symptômes cliniques du SQTS incluent l'arrêt cardiaque, la syncope, la mort subite ainsi que des palpitations et/ou étourdissements.²⁷⁹ Ces derniers sont par ailleurs presque toujours consécutifs à des épisodes de fibrillation auriculaire paroxystique, l'incidence de cette arythmie de l'oreillette étant élevée chez les patients souffrant de SQTS.²⁷⁹ Jusqu'à présent, seulement trois gènes ont été associés à ce syndrome, soient *HERG*, *KvLQT1* et *Kir2.1*, qui causent respectivement les formes SQT1, SQT2 et SQT3 de cette maladie. Des mutations augmentant l'amplitude des courants relatifs à chacun de ces gènes (i.e les courants I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1}) seraient à l'origine des symptômes observés en clinique.^{273, 274, 301}

Le syndrome de Brugada, pour sa part, est une forme de fibrillation ventriculaire idiopathique, c'est-à-dire qu'il apparaît en l'absence de malformations cardiaques. Il touche par ailleurs plus particulièrement le ventricule droit.³⁰² Ce syndrome a une forte prévalence en Asie du Sud-Est, où il affecte huit fois plus d'hommes que de femmes.³⁰³ Il

est caractérisé par un bloc de branche droite et une élévation du segment ST sur l'ECG (Figure 12D). Tout comme le LQTS, il peut également causer la mort subite.³⁰⁴ Le syndrome de Brugada a été associé à plusieurs mutations dans le gène *SCN5a*.³⁰⁵ Cependant, il apparaît évident que d'autres gènes sont également impliqués dans la pathogenèse de cette maladie. En effet, une étude de génotypage a rapporté que sur 130 sujets atteints de ce syndrome, seulement 20% étaient porteurs de mutations dans le gène *SCN5a*.³⁰⁶ Il y a quelques années, il a d'ailleurs été rapporté qu'un locus sur le chromosome 3 (3p22-25) était lui aussi associé au syndrome de Brugada, mais le gène en cause n'a cependant pas encore pu être identifié.³⁰⁷

Plus de 30 mutations dans le gène *SCN5a* ont été associées au syndrome de Brugada, entraînant toutes une diminution de l'amplitude du courant I_{Na} . Un déséquilibre des courants ioniques présents lors de la phase 1 du potentiel d'action de l'épicarde serait vraisemblablement impliqué dans la pathogenèse du syndrome de Brugada. Ce dernier entraîne une diminution des courants entrants I_{Na} et I_{Ca} ainsi qu'une augmentation relative du courant repolarisateur I_{to} . Par conséquent, le potentiel d'action de l'épicarde, qui a normalement une forme de dôme, se raccourcit et devient plutôt triangulaire, créant un gradient de voltage au niveau des phases 2 et 3 du potentiel d'action (dispersion de la repolarisation) qui se traduit par une élévation du segment ST sur l'ECG. En présence du syndrome de Brugada, les cellules du ventricule droit épiscardique sont réactivées par des gradients de voltage dus aux potentiels d'action plus longs provenant de régions voisines dans le myocarde, ce qui occasionne de l'arythmie ventriculaire.³⁰⁸ Enfin, bien que plusieurs mutations dans le gène *SCN5a* soient responsables du syndrome de Brugada, Akai *et al.*³⁰⁹ ont fait le lien entre la fibrillation ventriculaire idiopathique et une autre mutation dans ce gène (S1710L) chez un patient japonais. Cette mutation diminuait elle aussi l'amplitude du courant I_{Na} . Cependant, l'ECG du patient ne démontrait pas les caractéristiques typiques du syndrome de Brugada.³⁰⁹ L'ECG des patients atteints de fibrillation ventriculaire démontre une série d'oscillations chaotiques en remplacement des complexes QRS (Figure 12E).¹

La tachycardie ventriculaire catécholaminergique polymorphe (TVCP) est une autre arythmie cardiaque qui peut être causée par des mutations dans des canaux ioniques.

La tachycardie ventriculaire se distingue sur l'ECG par une série de complexes QRS élargis qui ne sont pas précédés par des ondes P (Figure 12F). Elle est dite monomorphe si tous les complexes QRS ont la même forme et polymorphe lorsqu'ils ont des formes différentes.¹ La TVCP est cependant difficile à diagnostiquer car elle survient en l'absence de malformations cardiaques et l'ECG des patients qui en sont atteints est apparemment normal lorsqu'ils sont au repos.²⁹⁶ Bien qu'elle puisse se développer à l'âge adulte, la TVCP se manifeste habituellement chez des enfants de plus de 10 ans, sous formes de palpitations ou de syncopes induites par l'exercice ou des émotions fortes.^{302, 310} Elle peut également provoquer la mort subite.³⁰² La TVCP a été reliée à des mutations dans le gène du récepteur de la ryanodine (*hRyR2*),^{311, 312} qui entraîneraient vraisemblablement une hyperactivité de celui-ci bien que ce sujet demeure controversé.³¹³ Postma *et al.*³¹⁴ ont également identifié trois mutations introduisant des codons stop dans le gène de la calséquestrine 2 (*CASQ2*) chez des patients atteints de TVCP. Le récepteur de la ryanodine et la calséquestrine 2 sont importants dans le maintien des concentrations intracellulaires de calcium des myocytes cardiaques. Les mutations qui y ont été retrouvées chez les sujets souffrant de TVCP pourraient provoquer une surcharge calcique des myocytes, celle-ci induisant à son tour une entrée d'ions Na^+ via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Dans un tel cas, la repolarisation de la cellule est altérée, ce qui donne lieu à des post-dépolarisations retardées. Celles-ci sont à l'origine des arythmies ventriculaires observées lors de la TVCP.³⁰² Enfin, bien que la majorité des cas de TVCP soient attribuables à des mutations dans les gènes *hRyR2* et *CASQ2*, certaines familles atteintes sont porteuses de mutations dans d'autres loci, ce qui suggère l'implication d'autres gènes dans l'apparition de la TVCP.³⁰²

Enfin, on en connaît beaucoup moins sur la génétique des quatre autres channelopathies mentionnées au tableau III. Aussi appelé "maladie de Lenègre", le trouble de conduction cardiaque est une atrophie progressive du nœud auriculo-ventriculaire et/ou du faisceau de His et des fibres de Purkinje. Cette pathologie cause un bloc de branches partiel ou un blocage auriculo-ventriculaire complet pouvant occasionner une syncope ou la mort subite.³¹⁰ La maladie de Lenègre a été associée à des mutations dans le gène *SCN5a*, qui provoqueraient une diminution de l'amplitude du courant I_{Na} .³¹⁵

D'autres mutations dans le gène *SCN5a* et ayant le même effet sur le courant I_{Na} ont aussi été associées au syndrome du sinus malade.³¹⁶ Celui-ci est caractérisé par un ralentissement de l'activité pacemaker des cellules cardiaques. Étant donné qu'il peut être accompagné d'un blocage auriculo-ventriculaire et de tachycardies supra-ventriculaires, ce syndrome est quelquefois appelé "syndrome bradycardie-tachycardie". Dans les cas sévères, il peut provoquer des syncopes vagues, mais rarement la mort subite.¹ Le syndrome du sinus malade a aussi été relié à une délétion d'une paire de base dans le gène *HCN4* (1631delC), qui est responsable du courant pacemaker I_f .³¹⁷ L'amplitude de ce courant est normalement augmentée par une hausse de la concentration intracellulaire d'AMPc, ce qui augmente la fréquence des battements cardiaques.³¹⁸ Cependant, la délétion rend le courant insensible à une telle situation, provoquant plutôt l'effet contraire.³¹⁷

Enfin, la fibrillation auriculaire (FA) est caractérisée par une série de contractions rapides et désordonnées des oreillettes,¹ se traduisant par une absence d'ondes P sur l'ECG (Figure 12G). Jusqu'à présent, seuls les gènes *KvLQT1*,^{319, 320} *Kir2.1*³²¹ et *MiRPI*³²² ont été associés à la FA. Tout d'abord, Chen *et al.*³¹⁹ ont identifié la mutation S140G dans le canal KvLQT1 chez des membres d'une famille dont plusieurs étaient atteints de FA. Ils ont proposé que cette mutation, qui augmente l'amplitude du courant I_{Ks} , pourrait mener à une diminution de la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire³¹⁹ qui sont propres à la FA. Cependant, plusieurs membres de la famille porteurs de cette mutation souffraient également du syndrome du QT long,³¹⁹ ce qui est paradoxal puisque ce dernier est plutôt associé à des mutations diminuant l'amplitude de I_{Ks} .²⁸⁴ Plus récemment, la mutation V141M a été identifiée dans le canal KvLQT1 et associée à la FA de même qu'au syndrome du QT court chez un nouveau-né. Les effets de cette mutation sur le courant I_{Ks} sont semblables à ceux qui sont produits par S140G et ils confirment l'hypothèse qu'une augmentation de l'amplitude de ce courant peut réduire la durée des potentiels d'action des oreillettes et des ventricules.³²⁰

Par ailleurs, la mutation V93I a été identifiée dans le canal potassique Kir2.1 chez tous les membres atteints de FA dans une famille chinoise. Cette mutation cause une augmentation de l'amplitude du courant I_{K1} , ce qui pourrait initier et/ou maintenir la FA

chez les membres de cette famille.³²¹ Pour ce qui est du gène *MiRP1*, il code pour une sous-unité β pouvant s'associer à KvLQT1 et produire un courant à activation constitutive.³²³ La mutation R27C a été identifiée dans la sous-unité MiRP1 de chacun des membres atteints de FA parmi deux familles chinoises alors qu'elle était absente chez 462 Chinois en bonne santé et sans lien de parenté avec les deux familles.³²² Il a été démontré que MiRP1-R27C entraînait une augmentation de l'amplitude du courant de background et que cette mutation était reliée à la FA chez ces familles chinoises.³²²

Cependant, les bases génétiques de la FA familiale étant encore très peu connues, il est présentement impossible d'associer une mutation, dans un gène particulier, à cette forme d'arythmie. Pour ce faire, il est d'abord nécessaire d'évaluer le pourcentage de cas cliniques possédant cette mutation. Il est également important de déterminer les polymorphismes communément retrouvés dans chaque gène afin d'éviter les faux positifs. Ce processus est complexe, car il implique d'analyser l'ADN d'un grand nombre d'individus de différents groupes ethniques. Par ailleurs, une mutation dans un gène donné doit aussi être présente chez les membres atteints dans plusieurs familles et absente chez un grand nombre d'individus témoins, ceci permettant de démontrer qu'elle a une forte probabilité d'être la cause de la maladie. Enfin, il est très utile d'effectuer des études d'association entre génotypes et phénotypes dans le but de définir l'impact de l'analyse génétique sur le traitement de la maladie en clinique.²⁹⁶

3. Fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire (FA) est caractérisée par des battements rapides, irréguliers et inefficaces des oreillettes. Elle est habituellement facile à reconnaître sur l'ECG, où l'activité auriculaire (onde P) est remplacée par une série d'ondes irrégulières et désordonnées qui apparaissent à une fréquence de plus de 350 par minutes.³²⁴ En effet, lors de la FA, les myocytes auriculaires se dépolarisent entre 400 et 600 fois par minute, ce qui est environ 10 fois supérieur au rythme normal.³²⁵

La FA est l'arythmie cardiaque la plus répandue en clinique et elle est associée à des taux de morbidité et de mortalité importants.^{326, 327} De plus, son incidence augmente avec l'âge. On estime qu'entre 0,2 et 0,3% des individus de moins de 40 ans et 5% à 9% de ceux qui ont plus de 60 ans sont atteints de FA.³²⁸ À l'heure actuelle, cette pathologie affecte 2,3 millions d'habitants aux États-Unis.³²⁹

3.1 Circuits de réentrées

L'élément initiateur de la FA est généralement un battement cardiaque prématuré, qui fait en sorte que l'activité électrique ne se propage plus de façon adéquate dans le myocarde. On parle alors d'activité ectopique ou de circuits de réentrées. Ces derniers apparaissent lorsqu'un influx électrique donne lieu à la propagation de deux ou plusieurs ondes de dépolarisation.¹

Selon des observations visuelles, des enregistrements échocardiographiques et des stimulations électriques sélectionnées, Mines a développé la notion de "longueur d'onde" et il en a conclu que les circuits de réentrées surviennent lorsque la longueur de l'onde de dépolarisation propagée dans le cœur est plus courte que celle qui est observée normalement.^{330, 331} Cette notion a été quantifiée une trentaine d'années plus tard par Wiener et Rosenblueth.³³² Ceux-ci ont démontré que la longueur d'onde était équivalente au produit de la période réfractaire et de la vitesse de conduction (et donc à la distance parcourue par l'onde de dépolarisation lors de la période réfractaire) et qu'elle est critique dans l'établissement d'un circuit de réentrée.

En 1977, Allesie *et al.*³³³ ont développé la théorie du "leading circle" (figure 13), selon laquelle les circuits de plus courtes longueurs d'onde devraient stimuler les tissus cardiaques à plus haute fréquence et ainsi devenir des circuits de réentrées et provoquer des arythmies. Cette théorie a été démontrée chez le chien. L'implantation d'électrodes au niveau des oreillettes et du faisceau de Bachmann a permis de stimuler le cœur de chiens à des fréquences variables pour induire l'apparition de certaines arythmies telles la FA et le "flutter" auriculaire, tout en enregistrant la longueur des ondes propagées. Dans l'oreillette, celles-ci étaient en moyenne de 14 à 18 cm en rythme sinusal et inférieures à 7,8 cm et 9,7 cm respectivement en présence de FA et de "flutter",³³⁴ le "flutter" auriculaire étant une activation rapide et ordonnée des oreillettes.¹

Plus récemment, une autre théorie a été développée au sujet des circuits de réentrées, soit celle de l'onde spiralée (Figure 13). Selon cette théorie, l'onde de dépolarisation se sépare en un endroit où la vitesse de conduction est réduite dû à un bloc de conduction et elle adopte une forme spiralée.³³⁵ Les caractéristiques de l'onde spiralée diffèrent de celles du "leading circle" en deux principaux points. Premièrement, selon la théorie de l'onde spiralée, l'émergence de circuits de réentrées nécessite que les tissus soient excitables et que l'amplitude de l'onde de dépolarisation soit suffisamment grande pour qu'elle puisse se propager efficacement; quant à la théorie du "leading circle", les réentrées dépendent de la longueur de l'onde et de la taille des tissus. Deuxièmement, le cœur de l'onde spiralée est excitable mais non excité, contrairement à celui de l'onde mise en jeu dans la théorie du "leading circle" qui est non excitable.

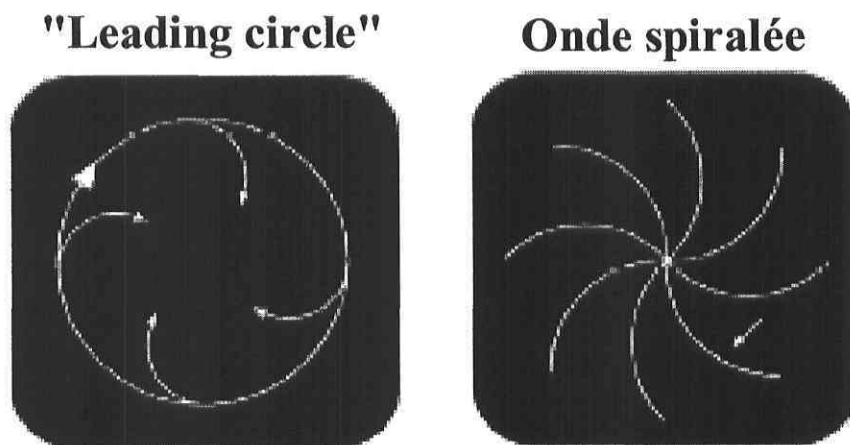


Figure 13. Circuits de réentrées selon les théories du "leading circle" (gauche) et de l'onde spiralée (droite). Dans le premier cas, la stabilité des circuits de réentrées est directement proportionnelle à la taille des tissus cardiaques et inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Dans le deuxième cas, le maintien des circuits de réentrées dépend de l'excitabilité des tissus et de l'amplitude de l'onde de dépolarisation. Le cœur de l'onde spiralée est excitable (flèche), mais non excité. Adaptée de Nattel *et al.*³³⁶

Certaines études^{337, 338} de même que des modèles mathématiques simulant l'activité de l'oreillette lors de la FA^{339, 340} ont démontré que les circuits de réentrées observés en présence de cette pathologie s'accordaient davantage avec la théorie de l'onde spiralée. Selon cette dernière, la suppression de l'excitabilité des tissus par l'inhibition du courant I_{Na} devrait mener à un agrandissement des ondes responsables des réentrées et ainsi provoquer l'arrêt de la FA. Or, des travaux ont démontré que l'administration de pilsicainide (bloqueur de canaux sodiques) chez des patients souffrant de FA chronique diminuait considérablement la récurrence de la maladie après cardioversion.³⁴¹ La théorie du "leading circle" prédit plutôt que la FA devrait être soutenue dans une telle situation, étant donné que la longueur des ondes de dépolarisation serait réduite vu la diminution de la vitesse de conduction. Cependant, une étude faite chez la chèvre a mis en évidence que des bloqueurs de canaux sodiques tels la cibenzoline, l'hydroquinidine, la flecainide et le d-sotalol pouvaient provoquer l'arrêt de la FA sans toutefois augmenter la longueur des ondes de dépolarisation.³⁴²

Les circuits de réentrées observés lors de la FA sont souvent engendrés par un bloc de conduction unidirectionnel causé par une détérioration non uniforme des fibres auriculaires (par exemple, suite à une ischémie). La propagation de l'onde de dépolarisation est alors bloquée dans un sens de la fibre et ralentie de l'autre. Prenons l'exemple de la figure 14 pour expliquer ce qui se produit dans un tel cas. Lorsque la fibre est intacte, le circuit emprunté par l'onde de dépolarisation est normal. Dans la fibre auriculaire altérée, le temps de conduction de l'onde est ralenti, car celle-ci est stoppée par le bloc de conduction dans la branche de gauche. Néanmoins, elle suit librement son chemin dans celle de droite. Elle vient alors exciter la portion de la branche de gauche qui n'avait pas été dépolarisée conséquemment au bloc de conduction et elle ré-excite la région de la fibre qui avait été dépolarisée initialement. Cependant, cette ré-excitation survient au-delà de la période réfractaire absolue mais avant qu'une nouvelle activité électrique normale ne reprenne, ce qui crée un circuit de réentrée. Ce dernier produit un potentiel d'action plus court et d'amplitude réduite au départ, ce qui peut engendrer un battement cardiaque prématuré.

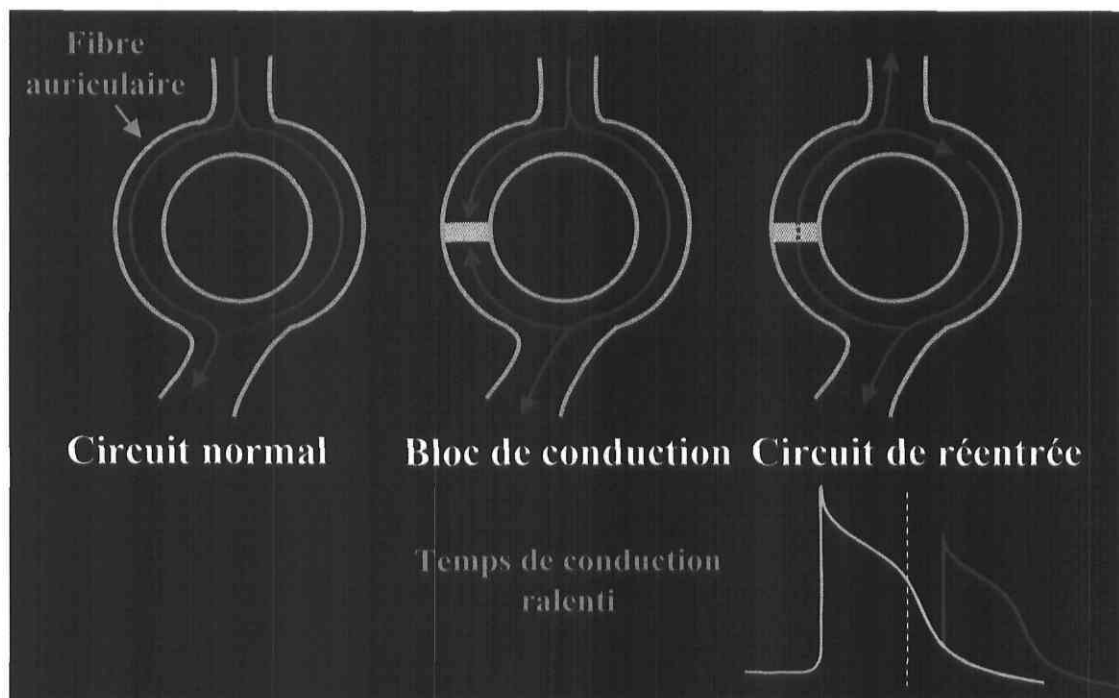


Figure 14. Circuit de réentrée provoqué par un bloc de conduction unidirectionnel. Dans la fibre auriculaire intacte, le circuit de l'onde de dépolarisation est normal. Le bloc de conduction ralentit la vitesse de propagation de l'onde et crée une ré-excitation des tissus dépolarisés initialement. Cette ré-excitation survient au-delà de la période réfractaire absolue (PRA), ce qui réduit l'amplitude et raccourcit la durée du potentiel d'action et donne lieu à un circuit de réentrée. La PRA s'étend du début de la dépolarisation jusqu'à la ligne pointillée, sur le schéma de potentiel d'action (Voir section 1.3.2).

Certaines régions du cœur, de par leur structure, peuvent potentiellement être génératrices de circuits de réentrées. C'est le cas, par exemple, des manchons musculaires entourant les veines pulmonaires. Haissaguerre *et al.*³⁴³ ont démontré une activité ectopique pouvant initier et même maintenir la FA chez certains patients. Selon des études anatomiques et électrophysiologiques faites chez le chien, l'orientation des fibres musculaires autour des veines pulmonaires change abruptement d'un alignement longitudinal vers un alignement transversal, ce qui est sujet à diminuer la vitesse de conduction et à causer des dépolarisations prématurées.^{344, 345} Par ailleurs, il a été démontré, à l'aide d'un modèle canin, que les myocytes situés près de ces veines ont un potentiel de repos inférieur à celui des myocytes de l'oreillette gauche (-66 versus -74

mV). La vitesse de dépolarisation y est également plus lente (98 par rapport à 259 V/s) et la durée du potentiel d'action est réduite de 16%,³⁴⁶ ce qui favorise les circuits de réentrées. L'arythmogénicité à la base des veines pulmonaires ne jouerait cependant pas un rôle clé chez les patients atteints de FA chronique.³⁴⁷

3.2 Remodelage électrique des oreillettes

Il est maintenant bien connu que plus les épisodes de FA sont de longue durée, plus la maladie est difficile à maîtriser. Wijffels *et al.*³⁴⁸ ont provoqué et maintenu artificiellement la FA sur un groupe de 12 chèvres à l'aide d'un fibrillateur auriculaire automatique. La FA a été maintenue pendant des intervalles de temps variant entre 24 heures et deux semaines. Parallèlement, les auteurs ont suivi l'activité auriculaire de ces chèvres sur ordinateur et ils se sont aperçu que la durée de la période réfractaire efficace était réduite de 35% après 24 heures de FA soutenue. Ils ont également noté que plus la FA était maintenue pendant une longue période, plus elle devenait persistante et facile à induire. Ainsi, ces auteurs ont été les premiers à mettre en évidence que la FA "entretient" la FA en provoquant un remodelage électrique des oreillettes.³⁴⁸

Un tel remodelage a par la suite été observé chez d'autres modèles animaux soumis à des stimulations rapides des oreillettes.³⁴⁹⁻³⁵¹ La forte augmentation du rythme cardiaque des oreillettes, lors de la FA, semble donc être l'élément déclencheur de leur remodelage électrique. Les mécanismes menant au raccourcissement de la période réfractaire efficace de l'oreillette, chez les patients atteints de cette forme d'arythmie, sont encore peu connus. Cependant, la surcharge calcique des cellules semblerait y jouer un rôle important.³⁵²

À chaque potentiel d'action, des ions Ca^{2+} entrent dans la cellule par l'intermédiaire des canaux calciques de type L. Cette entrée de calcium est d'autant plus grande que la fréquence cardiaque est élevée. Ainsi, lors de la FA, les concentrations intracellulaires des ions Ca^{2+} atteignent des niveaux pouvant être toxiques pour les myocytes. Pour se protéger, ceux-ci tendent à minimiser l'entrée de calcium en diminuant la densité du courant $I_{\text{Ca,L}}$. Une étude a démontré que la stimulation rapide des myocytes auriculaires du chien entraîne une inactivation (dépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) des canaux calciques de type L.³⁵³

Un tel mécanisme de défense pourrait donc être mis à profit par les myocytes au cours des premières minutes de FA. À plus long terme, on remarque une baisse d'expression des canaux calciques. Pour être fonctionnels, ceux-ci requièrent l'assemblage de trois sous-unités, soient $\alpha 1c$, $\alpha 2\sigma$ et β . Cependant, le rôle de chacune d'elles dans le fonctionnement des canaux calciques n'est pas très bien connu. Par ailleurs, les mécanismes menant à la diminution de l'expression de ces canaux lors de la FA sont encore controversés. Plusieurs études ont démontré une baisse des niveaux d'ARNm codant pour la sous-unité $\alpha 1c$ chez l'humain.³⁵⁴⁻³⁵⁶ Cependant, Grammer *et al.*³⁵⁷ ont plutôt observé une diminution significative de l'expression des sous-unités $\alpha 2\sigma$ et β . La réduction de la densité du courant $I_{Ca,L}$ et de l'expression des canaux calciques entraîne à coup sûr une diminution de la surcharge calcique lors de la FA, mais cela raccourcit également la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire efficace de l'oreillette (Figure 15),³⁵⁸ ce qui favorise les circuits de réentrées et le maintien de la FA.

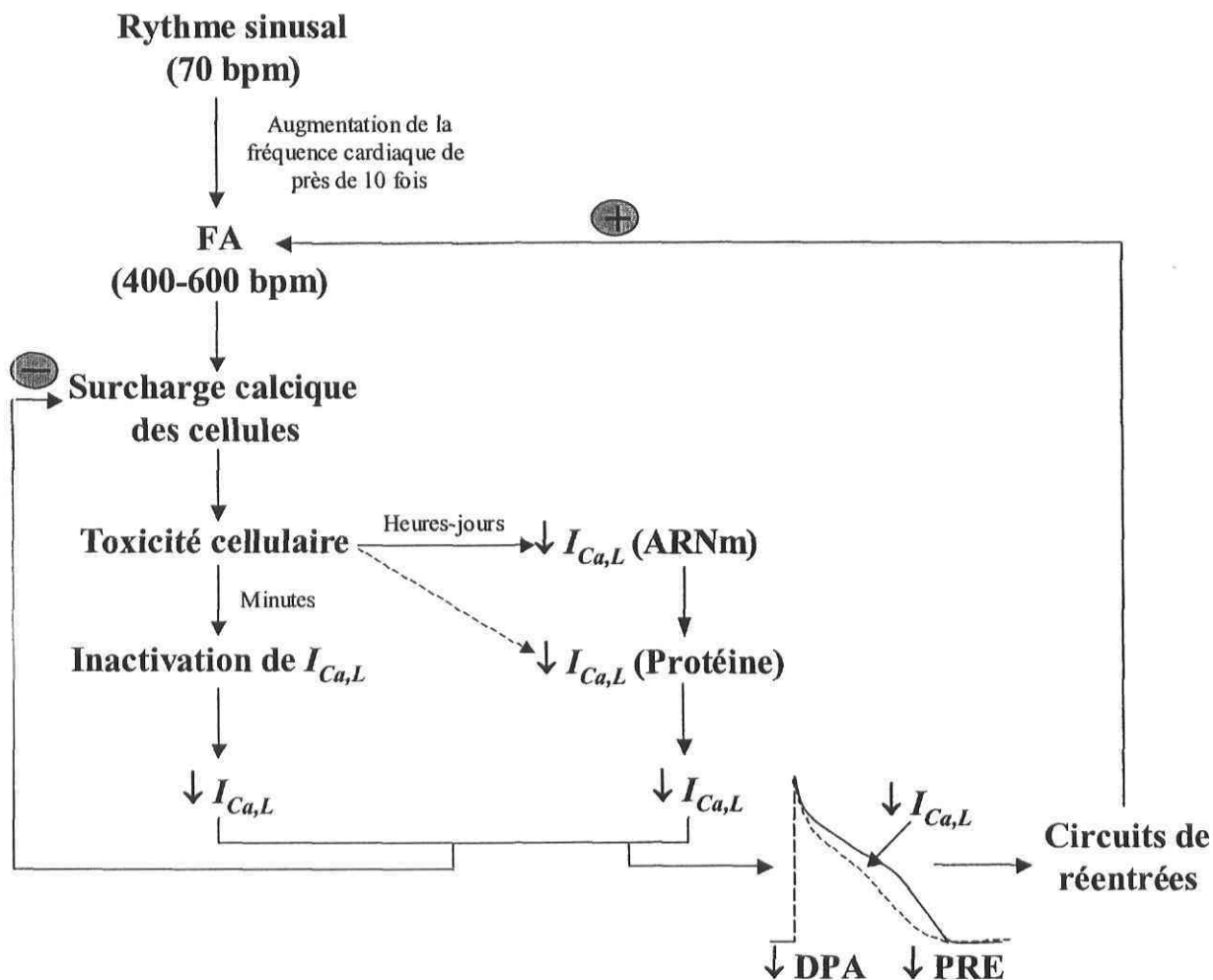


Figure 15. Schéma représentant les mécanismes potentiellement impliqués dans le remodelage électrique de l'oreillette lors de la FA. La fréquence cardiaque élevée induit une surcharge calcique dommageable pour les cellules. Ces dernières luttent contre l'entrée de calcium en inactivant le courant $I_{Ca,L}$ et en abaissant l'expression des canaux calciques, ce qui diminue la durée du potentiel d'action (DPA) et de la période réfractaire efficace (PRE) tout en stabilisant la FA. Inspiré de Shiroshita-Takeshita *et al.*³⁵⁹

Les niveaux d'ARNm codant pour les canaux potassiques Kv4.3 et Kv1.5 sont également réduits chez l'humain lors de la FA, de même que la densité des courants qu'ils génèrent (I_{to} et I_{Kur}).³⁶⁰⁻³⁶³ Ceci pourrait possiblement être un mécanisme de défense emprunté par les myocytes pour lutter contre la diminution de la durée du potentiel d'action. La FA diminue également la densité du courant I_{KATP} et l'expression du canal

potassique Kir6.2.^{364, 365} On note au contraire une augmentation de la densité du courant I_{KI} ainsi qu'une plus forte expression du canal correspondant, Kir2.1, chez les patients atteints de FA chronique.^{361, 366} Enfin, des études faites chez le chien ont démontré que l'induction de la FA entraîne une diminution des niveaux d'ARNm du canal sodique et de la densité du courant I_{Na} .³⁶⁷ De tels résultats n'ont cependant pas été observés chez l'humain.^{360, 364}

Enfin, le remodelage électrique produit par la FA inclut également des changements dans l'expression des jonctions gap, bien que les résultats à ce sujet soient passablement controversés. Les jonctions gap sont responsables de la conduction de l'influx électrique de cellule à cellule et elles sont formées de l'assemblage de deux connexons. Chacun de ces derniers est constitué de six protéines appelées "connexines". Trois isoformes de connexines sont exprimées dans le cœur: la 40 (retrouvée principalement dans l'oreillette), la 43 et la 45. Une étude faite chez la chèvre a mis en évidence que la FA induite par une stimulation rapide des oreillettes n'a pas eu d'effet sur la connexine 43, mais a produit une diminution et une hétérogénéité de l'expression de la connexine 40. En effet, alors que celle-ci est distribuée également dans les oreillettes en conditions normales, les auteurs ont retrouvé des régions (0,15 à 0,60 mm de diamètre, totalisant 25% de la surface auriculaire) dans lesquelles la densité de connexine 40 était faible suite à l'induction de la FA. Le niveau d'expression de cette connexine est demeuré inchangé dans les zones entourant ces régions.³⁶⁸ Cependant, chez l'humain, la FA a été associée autant à une augmentation^{369, 370} qu'à une diminution^{371, 372} de l'expression de la connexine 40 ainsi qu'à une redistribution de cette dernière vers les bords latéraux des myocytes auriculaires.³⁶⁹ Chez le chien, c'est une augmentation du niveau d'expression de la connexine 43 qui a été rapportée suite à l'induction de la FA.³⁷³ Récemment, cet effet a aussi été remarqué chez l'humain.³⁷⁰

3.3 Remodelage structural des oreillettes

Depuis plus de vingt ans, un bon nombre d'études ont démontré que la FA entraîne des changements structuraux importants dans les oreillettes, tels une fibrose des tissus

auriculaires et une dilatation, ce qui entrave sérieusement leurs fonctions. Il semble que la fibrose pourrait potentiellement être induite par l'angiotensine II, un agent hypertenseur de huit acides aminés dont l'expression est augmentée lors de la FA.³⁷⁴ D'une part, l'angiotensine II stimule la prolifération des fibroblastes cardiaques^{375, 376} et, d'autre part, elle augmente leur adhésion au collagène dans le cœur humain,³⁷⁶ un processus important lors de la cicatrisation. Des études ont par ailleurs démontré une diminution significative de la fibrose induite par la FA chez des chiens traités avec du candesartan, un bloqueur des récepteurs de l'angiotensine II.^{377, 378}

Enfin, il existe une relation claire entre la FA et la dilatation des oreillettes. Cependant, il est difficile de savoir si cette dilatation est une cause ou une conséquence de la maladie. Néanmoins, Sanfilippo *et al.*³⁷⁹ ont démontré une augmentation moyenne du diamètre des oreillettes de près de 40% en 20,6 mois chez des patients atteints de FA. Ces derniers n'avaient pas de malformations cardiaques ni de maladies cardiovasculaires autres que la FA et leurs oreillettes avaient une taille normale au début de l'étude, ce qui suggère que l'hypertrophie auriculaire serait une conséquence de la FA.³⁷⁹ Par la suite, il a été démontré que le diamètre des oreillettes de patients atteints de FA chronique était réduit suite à la restauration du rythme sinusal par une cardioversion.^{380, 381} L'hypertrophie auriculaire induite par la FA a également été démontrée chez le chien.³⁴⁹

3.4 Remodelage ultra-structural des oreillettes

La FA modifie également l'ultra-structure des oreillettes. Morillo *et al.*³⁴⁹ ont provoqué cette forme d'arythmie chez des chiens et, en utilisant la technique de microscopie électronique, ils ont noté une augmentation importante du nombre et de la taille des mitochondries ainsi qu'une fragmentation du réticulum sarcoplasmique.³⁴⁹ Ces modifications ont aussi été observées quelques années plus tard chez la chèvre, où l'induction de la FA a également provoqué une myolyse, une accumulation de glycogène et une dispersion de la chromatine dans les nucléoplasmes.³⁸² Ces altérations ressemblent à celles qui sont typiques du myocarde hibernant³⁸³ et elles sont les signes d'une dédifférenciation des myocytes. Des travaux ont d'ailleurs rapporté la présence de

myocytes auriculaires hibernants chez des patients ayant fait de la FA suite à un pontage coronarien, ces myocytes présentant une accumulation de glycogène et une dispersion de la chromatine.³⁸⁴

Ensuite, une étude effectuée sur une lignée de myocytes auriculaires de souris (HL-1) a mis en évidence qu'une stimulation excessivement rapide de ces cellules diminue l'expression de la sous-unité α_1c du canal calcique de type L consécutivement à l'activation de protéases telle la calpaïne I.³⁸⁵ En plus de dégrader les canaux ioniques, cette dernière pourrait aussi s'attaquer aux myofilaments, comme c'est le cas des caspases (d'autres protéases du myocarde).^{386, 387} L'activité de la calpaïne I est largement augmentée chez l'humain lors de la FA.^{384, 388} Une désintégration importante des myofilaments a par ailleurs été observée dans les oreillettes de patients atteints de cette pathologie, ce qui suggère que la calpaïne I pourrait être impliquée dans la perte de contractilité des tissus auriculaires qui est propre à la FA.³⁸⁸

3.5 FA et risque de thromboses et d'embolies

Une thrombose est la formation d'un caillot dans un vaisseau sanguin ou dans une des cavités du cœur (oreillettes ou ventricules) alors qu'une embolie se définit comme étant l'obstruction d'un vaisseau sanguin par un corps circulant (ex.: plaque d'athérome rompue). La FA résulte en quelque sorte en une absence de contraction des oreillettes, ce qui provoque une stagnation du sang dans ces cavités du cœur et éventuellement la formation de caillots. C'est pourquoi cette forme d'arythmie est associée à un risque considérable de thromboses et d'embolies,³⁸⁹ dont plus particulièrement les accidents vasculaires cérébraux (AVC). On estime que près de 15% des AVC sont attribuables à la FA.³⁹⁰

Chez les patients atteints de FA, 90% des caillots sanguins (thrombus) responsables des AVC se forment dans l'appendice de l'oreillette gauche.³⁹¹ Dans un tel cas, le thrombus quitte l'oreillette gauche et bloque une artère cérébrale ou une artère carotide.³⁹² L'hypercoagulabilité observée lors de la FA se traduit par des niveaux élevés de fibrinogène, de D-dimère de fibrine, de P-sélectine et du facteur von Willebrand.^{393, 394} Le fibrinogène se trouve dans le plasma sanguin et contribue à la formation de la fibrine, une

substance protidique filamenteuse, blanchâtre et élastique qui enserre les globules sanguins lors de la coagulation. Le D-dimère de fibrine reflète le turnover intra-vasculaire de la fibrine et est un marqueur de la formation de thrombus.³⁹⁵ Pour ce qui est de la P-sélectine et du facteur von Willebrand, ce sont respectivement des marqueurs de l'activation des plaquettes et de dommages et dysfonctions des cellules endothéliales.³⁹⁶ Une étude effectuée sur 994 patients atteints de FA a démontré un lien entre l'incidence des AVC et les niveaux sanguins accrus du facteur von Willebrand, mais pas de la P-sélectine, ce qui suggère que les dommages aux cellules endothéliales ou le facteur von Willebrand lui-même pourraient être d'une importance particulière dans le caractère pro-thrombotique de la FA.³⁹⁴ Par ailleurs, il semble que la protéine C réactive (CRP), un marqueur de l'inflammation dont la concentration sanguine augmente entre autres lors de maladies cardiaques telles l'angine ou l'infarctus du myocarde, est retrouvée plus en abondance chez les patients atteints de FA persistante par rapport à ceux qui ont la forme paroxystique de la maladie.³⁹⁷ Des études ont par la suite démontré que des niveaux élevés de CRP pouvaient prédire le développement futur de la maladie³⁹⁸ et qu'ils augmentaient le risque d'AVC.³⁹⁹

Enfin, les thrombus formés en présence de FA peuvent aussi apparaître dans l'oreillette droite et se diriger vers les artères pulmonaires, provoquant de ce fait des embolies pulmonaires.¹ Par ailleurs, il arrive également qu'un thrombus formé dans l'oreillette gauche obstrue une artère coronaire, causant une ischémie cardiaque.⁴⁰⁰

3.6 Formes de fibrillation auriculaire

La plupart du temps, la FA est associée à d'autres maladies telles l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde. Les cas où la FA se déclare suite à une chirurgie cardiaque viennent au second rang. Enfin, ce type d'arythmie peut également survenir sans cause apparente (FA idiopathique) et/ou avoir une incidence familiale. Les cas de FA idiopathique et familiale sont cependant les moins répandus.

3.6.1 Fibrillation auriculaire associée à d'autres maladies

Près de 50% des cas de FA paroxystique (apparaissant et disparaissant de façon transitoire) et plus de 80% de ceux de FA chronique sont associés à des maladies affectant la structure et le fonctionnement du cœur.⁴⁰¹ Par exemple, l'insuffisance cardiaque est l'une des maladies les plus communément associées à la FA.⁴⁰² Il s'agit d'une incapacité du cœur à assurer, dans des conditions normales, le débit sanguin nécessaire aux besoins de l'organisme. L'insuffisance cardiaque peut atteindre le côté gauche ou droit du cœur, ou les deux. Ses symptômes sont, entre autres, l'œdème pulmonaire, une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire et un œdème des membres inférieurs.³⁹² Selon des études cliniques, l'incidence de la FA varie de 10 à 50% chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque et elle augmente avec la sévérité de la maladie.⁴⁰³⁻⁴⁰⁶ On estime que l'insuffisance cardiaque augmente de 6 fois le risque de FA.⁴⁰⁷

Les mécanismes par lesquels l'insuffisance cardiaque peut causer la FA ne sont pas très bien connus. Cependant, cette pathologie est associée à une hausse du niveau sanguin de catécholamines⁴⁰⁸ et à une stimulation du système nerveux sympathique.⁴⁰⁹ Une telle stimulation mène à un raccourcissement de la période réfractaire, ce qui est propice au développement de la FA. Ensuite, l'insuffisance cardiaque cause une dilatation des oreillettes, ce qui peut éventuellement modifier leurs propriétés électrophysiologiques et provoquer la fibrose des tissus, deux phénomènes susceptibles d'induire la FA.⁴¹⁰ Il est connu que l'étirement des tissus cardiaques dépolarise les cellules et augmente la durée du potentiel d'action tout en induisant des dépolarisations diastoliques. Ces changements électrophysiologiques sont dus au moins en partie à l'ouverture des "stretch activated channels" (SACs).⁴¹¹ Ces derniers sont des canaux cationiques non sélectifs qui pourraient, selon la littérature, être activés par la tension sur le cytosquelette ou sur la membrane cellulaire.⁴¹²

La FA est aussi une complication relativement fréquente de l'infarctus du myocarde, apparaissant dans 6,5% des cas selon l'étude clinique GUSTO-3 (Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries 3).⁴¹³ En effet, l'infarctus du myocarde est causé par un manque d'oxygénation des tissus ventriculaires suite à l'obstruction d'une

artère coronaire (i.e. l'ischémie); l'ischémie au niveau de l'oreillette peut en elle-même provoquer la FA. Ce fait a été démontré chez le chien, où la ligature d'une artère coronaire de l'oreillette a provoqué une FA soutenue conséquemment, semble-t-il, à un ralentissement de la vitesse de conduction et à l'apparition de circuits de réentrées.⁴¹⁴

Enfin, les maladies de la valve mitrale et l'hypertension peuvent elles aussi causer la FA. La valve mitrale est située entre l'oreillette et le ventricule gauches. L'ouverture anormale de cette valve (insuffisance mitrale) entraîne un reflux de sang vers l'oreillette gauche.¹ Il a été démontré, chez un modèle canin, que la FA pouvait apparaître en présence d'une insuffisance mitrale conséquemment à une hypertrophie de l'oreillette gauche. Par ailleurs, ce même modèle a mis en évidence que l'insuffisance mitrale provoquait aussi une hausse importante du contenu en glycogène des myocytes de l'oreillette gauche ainsi que de l'inflammation et de la fibrose, ce qui pourrait éventuellement intervenir dans le développement de la FA.⁴¹⁵

Pour ce qui est de l'hypertension, elle est connue comme étant le plus important facteur de risque de développement de la FA.⁴⁰⁰ Son lien avec cette arythmie réside en partie dans le remodelage structural et électrique de l'oreillette. En effet, la dilatation de l'oreillette gauche constitue l'un des mécanismes d'adaptation du myocarde face à une augmentation chronique de la pression artérielle.⁴¹⁶ Ceci mène au raccourcissement de la période réfractaire efficace de l'oreillette tout en créant des circuits de réentrées qui sont propices au développement de la FA.^{417, 418} Par ailleurs, lorsque le cœur est soumis à une surcharge hémodynamique, comme c'est le cas en présence d'hypertension, les oreillettes sécrètent un peptide natriurétique. Ce dernier a des effets diurétiques, réduisant la résistance vasculaire et inhibant la stimulation du système nerveux sympathique.⁴¹⁹ Or, la FA a été associée à des niveaux sanguins élevés de ce peptide. En effet, une étude faite sur un groupe de patients atteints de FA chronique a démontré une réduction de la concentration sanguine moyenne du peptide natriurétique de 138 pg/mL à 116 pg/mL une heure après la restauration du rythme sinusal par cardioversion.⁴²⁰

3.6.2 Fibrillation auriculaire post-opératoire

La FA peut aussi survenir suite à une chirurgie cardiaque, soit en moyenne de 2 à 5 jours après l'opération. Avec une incidence variant de 10 à 50%,⁴²¹ c'est la complication la plus commune suite à un pontage coronarien. La FA post-opératoire double le taux de mortalité cardiovasculaire⁴²² et de morbidité.³⁹⁷ Différents facteurs prédisposant à cette forme de FA ont été rapportés, dont l'âge avancé,⁴²³ la présence de maladies coronariennes telle que l'ischémie,⁴²⁴ l'insuffisance rénale,⁴²¹ des niveaux sanguins élevés du peptide natriurétique de type B (brain natriuretic peptide) avant l'opération,⁴²⁵ un haut niveau d'expression de la connexine 40 dans les myocytes auriculaires⁴²⁶ et la surcharge calcique des myocytes. Une étude électrophysiologique effectuée auprès de patients ayant subi un pontage coronarien ou un pontage et un remplacement de la valve aortique a démontré que la densité du courant $I_{Ca,L}$ mesurée avant la chirurgie était supérieure chez les patients ayant fait de la FA post-opératoire.⁴²⁷

L'hypothèse selon laquelle la concentration de potassium sanguin pourrait avoir une influence significative sur l'incidence de la FA post-opératoire a aussi été émise. En effet, dans une étude prospective menée par Wahr *et al.*,⁴²⁸ un taux de potassium sanguin inférieur à 3,5 mM a été identifié comme étant un facteur prédisposant à des arythmies péri- et post-opératoires (rapports de cotes de 2,2 et 1,7, respectivement). Par contre, Brandt *et al.*³⁶² n'ont pas pu mettre ce facteur prédisposant en évidence, ceci pouvant être attribuable à la différence importante dans le nombre de patients ayant participé à chacune des études. En effet, alors que celle de Wahr *et al.*⁴²⁸ portait sur 2402 patients (dont 865 ont fait de la FA ou du flutter auriculaire post-opératoire), l'étude de Brandt *et al.*³⁶² n'a été menée que sur 33 patients. De ceux-ci, 8 étaient atteints de FA au moment de la chirurgie et des 25 autres, 12 ont fait de la FA post-opératoire. Les niveaux pré-opératoires moyens de potassium sanguin étaient légèrement supérieurs à 4 mM dans chacun des groupes.³⁶²

Des études récentes suggèrent également une implication de la réaction inflammatoire dans la FA post-opératoire. À ce sujet, Mandal *et al.*⁴²⁹ ont démontré que le niveau sanguin pré-opératoire des anticorps anti-HSP65 était significativement plus élevé chez des patients ayant fait de la FA post-pontage, comparativement à un groupe de

patients-contrôles (rapport de cote de 1,41). Les protéines HSP (heat shock proteins) sont des chaperones exprimées à la surface cellulaire uniquement lors d'un stress⁴³⁰ tel qu'une chirurgie, où elles jouent un rôle dans la préservation de l'intégrité cellulaire en maintenant les protéines dans leur état correctement replié.⁴³¹ Par ailleurs, Gaudino *et al.*⁴³² ont démontré un lien étroit entre le polymorphisme -174G/C du promoteur de l'interleukine 6 (une glycoprotéine stimulant la croissance et la différenciation des lymphocytes B), la réponse inflammatoire à la chirurgie et le développement de la FA post-opératoire. Dans cette étude, effectuée auprès de 110 patients ayant subi un pontage coronarien, les génotypes GG, CT et CC ont été retrouvés à la position -174 du promoteur de l'interleukine 6 et le génotype GG a été associé à des niveaux sanguins supérieurs d'interleukine 6 après la chirurgie ainsi qu'à une incidence accrue de FA post-opératoire. En effet, celle-ci s'est développée chez 33,9% et 10,4% des patients ayant les génotypes GG et CT ou CC, respectivement. Ceci suggère une modulation génétique de ce type de FA.⁴³²

Une autre étude a quant à elle rapporté que la FA post-opératoire était associée au stress oxydatif et particulièrement à la formation de peroxy-nitrite.⁴³³ Celui-ci provoque la nitration sélective des résidus tyrosine des protéines et déstabilise le contrôle énergétique de la cellule.⁴³⁴⁻⁴³⁶ La créatine kinase myofibrillaire, une protéine importante dans le contrôle de la contractilité des myocytes, est très sensible au stress oxydatif. La nitration de cette protéine par le peroxy-nitrite⁴³⁵ peut altérer son activité.⁴³³ La nitration peut aussi entraîner un changement dans la prédominance des isoformes de myosine dans les oreillettes, chez les patients atteints de FA (prédominance de l'isoforme β par rapport à l'isoforme α chez les sujets normaux). Ce changement est possiblement dû à la baisse de production d'ATP ou à l'accumulation d'ADP myofibrillaire. Cette accumulation d'ADP peut affecter la fonction contractile des oreillettes.⁴³³ Le rôle du stress oxydatif dans le remodelage électrophysiologique de l'oreillette et le développement de la FA post-opératoire a été confirmé par Carnes *et al.*⁴³⁷ Ceux-ci ont démontré, à l'aide d'un modèle canin, que l'administration d'ascorbate atténuait le raccourcissement de la période réfractaire efficace occasionné par des stimulations rapides des oreillettes, tout en prévenant la nitration des protéines. Ils ont également observé que l'ascorbate réduisait de moitié l'incidence de la FA post-opératoire chez des patients ayant subi un pontage coronarien.⁴³⁷ L'ascorbate est un anti-oxydant physiologique qui décompose le peroxy-nitrite.⁴³⁸ Plus

récemment, la simvastatine, un médicament utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie et ayant des propriétés anti-oxydantes, a été reconnu pour atténuer le remodelage électrophysiologique induit par la tachycardie auriculaire, chez le chien, de même que le développement de la FA et la diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 1c$ des canaux calciques de type L.⁴³⁹

Enfin, le système nerveux autonome joue lui aussi un rôle très important dans le développement de la FA, et plus particulièrement dans la genèse de la FA post-opératoire. Ce système inclut la composante sympathique sollicitée lors d'un stress et la composante parasympathique, qui elle entre en jeu à l'état de repos. Il a été démontré que suite à un pontage coronarien, les niveaux sanguins de catécholamines (principalement la norépinéphrine, un neurotransmetteur) s'élèvent, ce qui témoigne d'une augmentation de la stimulation du système nerveux sympathique.⁴⁴⁰⁻⁴⁴² L'excès de catécholamines peut causer de la FA post-opératoire en endommageant les oreillettes. C'est ce qu'ont démontré des biopsies d'oreillettes droites de patients ayant subi un pontage coronarien.⁴⁴³ Par ailleurs, les catécholamines ont une forte affinité pour les récepteurs β -adrénergiques et les courants repolarisateurs I_{Kur} et I_{Ks} sont activés par la stimulation adrénérgique, ce qui tend à raccourcir la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire efficace et mène au développement de la FA.⁴⁴⁴

Le système nerveux parasympathique a lui aussi une influence sur le développement de la FA. Ce système inclut le nerf vague. La stimulation vagale diminue l'automaticité du nœud sinusal et nuit à la conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire.⁴⁴⁵ De plus, elle provoque la production d'acétylcholine, un activateur du courant potassique repolarisateur I_{KAch} .³⁶⁶ Ceci entraîne un raccourcissement de la durée du potentiel d'action auriculaire et de la période réfractaire efficace⁴⁴⁶ et prédispose à la FA. Selon la littérature actuelle, la FA post-opératoire provoquée par des stimulations du système nerveux autonome semble cependant davantage reliée à la composante sympathique.

3.6.3 Fibrillation auriculaire idiopathique et familiale

La FA idiopathique est celle qui apparaît sur des cœurs sains en l'absence de toute autre maladie, alors que la FA familiale affecte plusieurs membres d'une même famille de façon autosomale dominante (i.e. sans saut de génération). La FA familiale est rare, bien que des prédispositions génétiques susceptibles de causer cette maladie puissent être fréquentes.⁴⁴⁷ Celle-ci compte en fait parmi les cas de FA idiopathique, qui incluent entre 2 et 16% des patients atteints de FA.^{448, 449} Une étude effectuée par Darbar *et al.*⁴⁵⁰ indique que 5% des patients souffrant de FA et jusqu'à 15% des individus affectés par la FA idiopathique pourraient avoir une forme familiale de la maladie.

Le premier cas de FA familiale a été identifié en 1943.⁴⁵¹ Depuis, plusieurs autres ont été rapportés, mais à l'heure actuelle, peu de gènes et de loci chromosomiques ont pu être associés à la maladie. Deux gènes de sous-unités α (*KvLQT1* et *Kir2.1*) et un d'une sous-unité β (*MIRP1*) de canaux potassiques ont été associés à la FA au cours des trois dernières années, tel que mentionné à la fin de la section sur les channelopathies. Ce type d'arythmie a aussi été associé aux loci 5p13,⁴⁵² 6q14-16⁴⁵³ et 10q22-24⁴⁵⁴ chez certaines familles, bien que les gènes en cause ne soient pas encore identifiés.

Une autre étude a observé un lien possible entre la FA et la mutation mtDNA⁴⁹⁷⁷.⁴⁵⁵ Cette dernière est une délétion de 4977 paires de bases dans l'ADN mitochondrial, située entre les paires de bases 8470 et 13446 selon la carte génétique de l'ADN mitochondrial humain d'Anderson *et al.*⁴⁵⁶ Lai *et al.*⁴⁵⁵ ont remarqué une corrélation positive entre la quantité, dans les oreillettes, de cet ADN mitochondrial délété et l'incidence de la FA sur un groupe de 66 patients adultes, dont 26 étaient atteints de FA. Ils ont remarqué que le niveau de mtDNA⁴⁹⁷⁷ augmentait significativement avec l'âge, mais plus encore en présence de FA.⁴⁵⁵ Des mutations dans l'ADN mitochondrial peuvent contribuer au vieillissement des organes⁴⁵⁷ et, de plus, une augmentation de mtDNA⁴⁹⁷⁷ a été retrouvée en présence d'ischémie du myocarde chez certains patients.⁴⁵⁸ Il serait donc possible que la haute fréquence cardiaque observée lors de la FA provoque une très forte consommation d'oxygène et entraîne une accumulation d'ADN mitochondrial muté ou délété. Cependant, les résultats observés par Lai *et al.*⁴⁵⁵ ne sont pas très représentatifs, car leur étude a été

effectuée sur des patients ayant eu une opération à cœur ouvert et qui présentaient tous des malformations cardiaques. Ceci pourrait éventuellement avoir une influence sur la quantité de mtDNA⁴⁹⁷⁷ mesurée.⁴⁵⁵

Enfin, une étude menée par Lamarche *et al.*⁴⁵⁹ a également fait l'analyse du gène de la connexine 40 chez trois familles atteintes de FA. Cette approche était très pertinente, puisqu'au niveau cardiaque, cette connexine est exprimée seulement dans l'oreillette. Cependant, le gène de la connexine 40 ne semblait pas être impliqué dans le développement de la FA, du moins pour les familles étudiées.⁴⁵⁹ De plus en plus d'études visent à établir les bases génétiques de la FA et certaines d'entre elles ont identifié des mutations qui tendent à être reliées au développement de ce type d'arythmie. Cependant, il faudra encore beaucoup de travail avant de pouvoir relier un gène à la FA, c'est-à-dire génotyper un grand nombre de patients de plusieurs groupes ethniques afin de s'assurer que la mutation retrouvée dans le gène est présente chez de nombreux sujets atteints et généralement absente chez les personnes saines.

3.7 Traitement de la fibrillation auriculaire

La prise en charge actuelle des patients atteints de FA repose sur deux stratégies distinctes. On vise d'une part à contrôler la cadence ventriculaire grâce à des agents pharmacologiques qui diminuent la vitesse de conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire. D'autre part, on vise la restauration et le maintien du rythme sinusal à l'aide, respectivement, d'une cardioversion (pharmacologique ou électrique) et d'un traitement pharmacologique (voir plus loin). Souvent, on doit également prescrire un anticoagulant visant à minimiser le risque de thromboses et d'embolies relié à la FA, surtout chez les patients âgés ou qui ont déjà eu un AVC. Enfin, si le traitement pharmacologique ne suffit pas à contrôler la FA, certaines chirurgies peuvent être pratiquées.^{460, 461}

3.7.1 Contrôle de la cadence ventriculaire

Cet aspect du traitement de la FA est particulièrement important, puisque le dérèglement du rythme d'activation des ventricules entraîne éventuellement des changements irréversibles dans la structure et le fonctionnement des oreillettes, et donc la chronicité de la maladie.^{462, 463} En effet, des études effectuées chez la chèvre ont démontré qu'un rythme ventriculaire élevé, en présence de tachycardie auriculaire, menait au développement d'une insuffisance cardiaque, qui à son tour induisait un remodelage électrique et structural des oreillettes.^{462, 463} Par contre, la seule présence d'une tachycardie auriculaire n'a pas entraîné de changements dans l'ultrastructure des oreillettes.⁴⁶³

Des β -bloquants, des inhibiteurs de canaux calciques et la digoxine peuvent être utilisés pour régulariser la cadence ventriculaire.⁴⁶⁴ Les β -bloquants tels le métoprolol, le propranolol et l'esmolol prolongent le temps de conduction au nœud auriculo-ventriculaire en interagissant avec les récepteurs β -adrénergiques.⁴⁶⁵ Comme la dépolarisation des cellules du nœud auriculo-ventriculaire se fait par l'intermédiaire de canaux calciques, des agents pharmacologiques visant à bloquer de tels canaux, comme le diltiazem et le verapamil, vont en conséquence diminuer la vitesse de conduction dans ces cellules. Cependant, les médicaments qui bloquent les canaux calciques doivent être utilisés avec prudence chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque.⁴⁶⁵ Pour ce qui est de la digoxine, c'est un antiarythmique qui inhibe la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase et qui diminue la conduction des influx électriques au niveau du faisceau de His. Cependant, elle n'agit pas très rapidement et elle crée une surcharge calcique des cellules qui prédispose au remodelage électrique des oreillettes.⁴⁶⁶ L'intérêt de la digoxine, de par son action cardiotonique, est limité aux patients ayant une insuffisance cardiaque associée à la FA.⁴⁶⁷

3.7.2 Restauration et maintien du rythme sinusal

Environ 50% des patients nouvellement atteints de FA retournent spontanément en rythme sinusal en 24 heures ou moins.⁴⁶⁸ Dans les autres cas, la restauration du rythme sinusal, ou cardioversion, se fait généralement par la prise d'anti-arythmiques de classes IA

(quinidine), IC (flecainide, propafenone) ou III (ibutilide, amiodarone, dofetilide).⁴⁶⁹ Selon la classification de Vaughan-Williams, les anti-arythmiques de classe I bloquent les canaux sodiques tout en prolongeant l'intervalle QT (classe IA) ou en ralentissant la conduction du potentiel d'action (classe IC),²³⁷ réduisant de ce fait la probabilité de déclencher des circuits de réentrées. Lorsque la prise d'anti-arythmiques ne suffit pas à restaurer le rythme sinusal, une cardioversion électrique est nécessaire. Dans un tel cas, le foyer d'activité ectopique est d'abord identifié, puis éliminé à l'aide de radiofréquence, de rayons laser, d'ultrasons ou de micro-ondes. Ces techniques éliminent les circuits de réentrées en créant des blocs de conduction par la chaleur. Cependant, la radiofréquence, qui est la technique de cardioversion la plus répandue, utilise une alternance de chaleur et de courant électrique.⁴⁷⁰ Si la FA est présente depuis plus de 48 heures, il faut traiter le patient avec un anticoagulant comme la warfarine pour au moins 3 à 4 semaines avant la cardioversion. La warfarine est l'anticoagulant le plus communément utilisé pour réduire le risque de thromboses et d'embolies associé à une variété de maladies cardio-vasculaires. Elle inhibe l'interconversion cyclique de la vitamine K et de l'époxyde de vitamine K, ce qui réduit les niveaux de certains facteurs de coagulation dépendants de cette vitamine (facteurs II, VII, IX et X).⁴⁷¹ Une échocardiographie trans-oesophagienne permettant de visualiser la présence de thrombus dans les oreillettes peut également être pratiquée et si rien n'est détecté, la cardioversion est effectuée sans la prise initiale d'anticoagulants.⁴⁷²

La récurrence de la FA après une cardioversion électrique ou pharmacologique est fréquente, surtout si des agents anti-arythmiques ne sont pas utilisés. Une variété de médicaments peuvent être prescrits pour maintenir le rythme sinusal et plusieurs d'entre eux sont les mêmes que ceux qui sont utilisés pour la cardioversion pharmacologique. L'amiodarone est l'un des médicaments les plus efficaces pour préserver le rythme sinusal après une cardioversion.⁴⁷³ Il n'a pas d'effet pro-arythmique, selon l'essai clinique CTAF (Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators). Cependant, son usage à long terme est souvent limitée par sa toxicité pour la thyroïde, les poumons, le foie, la peau et les yeux.⁴⁷³ Certains agents anti-arythmiques de classe I tels la propafenone et la flecainide sont aussi efficaces pour le maintien du rythme sinusal,²³⁷ bien qu'ils puissent créer des arythmies ventriculaires.^{474, 475}

Ainsi, le traitement idéal pour les patients atteints de FA serait un contrôle à la fois du rythme sinusal et de la cadence ventriculaire. Cependant, plus la FA devient chronique, moins il y a de chances que le rythme sinusal ne soit maintenu suite à une cardioversion.^{476, 477} L'intérêt est donc, selon certains essais cliniques, de miser sur le contrôle de la cadence ventriculaire plutôt que sur le maintien du rythme sinusal.^{478, 479}

3.7.3 Traitement chirurgical

Quand le traitement pharmacologique ou la cardioversion électrique ne parviennent pas à contrôler la FA de façon satisfaisante, certaines techniques chirurgicales peuvent être utilisées. De celles-ci, la technique Maze est la plus efficace,⁴⁸⁰ avec un taux de succès de 75 à 99%.⁴⁸¹⁻⁴⁸⁴ Elle consiste à faire des incisions et des cryolésions sur les oreillettes afin de limiter les possibilités de circuits de réentrées occasionnés par la FA. Ces incisions permettent également de diriger le potentiel d'action spécifiquement du nœud sinusal vers le nœud auriculo-ventriculaire, ce qui permet une activation électrique coordonnée des oreillettes et des ventricules. Les composants-clés de la technique Maze, aussi appelée Cox-Maze III, incluent l'isolement des veines pulmonaires (qui sont des sources potentielles de circuits de réentrées) ainsi que des incisions dans la paroi de l'oreillette gauche.⁴⁸⁵ Cette intervention chirurgicale a cependant certains risques, tels la sténose des veines pulmonaires,⁴⁸⁶ les fistules auriculo-oesophagiennes^{487, 488} et la tamponade cardiaque.⁴⁸⁹ Celle-ci est une compression aiguë du cœur par un épanchement abondant dans le péricarde.³²⁴

Par ailleurs, certains patients atteints de FA chronique depuis plusieurs années ont aussi de graves maladies cardio-pulmonaires nécessitant l'emploi de broncho-dilatateurs qui augmentent la conduction au nœud auriculo-ventriculaire par une stimulation β -adrénergique. De tels patients peuvent avoir une déficience primaire du nœud auriculo-ventriculaire, nécessitant l'ablation de ce dernier et l'implantation d'un pacemaker.³²⁴

3.8 Polymorphismes potentiellement impliqués dans le développement de la FA

Comme on le sait, les mutations dans l'ADN entraînent des changements rares dans certaines protéines et provoquent des maladies congénitales. Les polymorphismes, quant à eux, sont des variants communs de certains gènes, pouvant néanmoins occasionner une variabilité dans le phénotype de certaines maladies et dans la réponse aux médicaments.¹⁶⁸ La littérature rapporte d'ailleurs que des polymorphismes dans certains gènes semblent être associés au développement de la FA, particulièrement pour ce qui est de la connexine 40 (Cx40). Les connexines forment des connexons (assemblage de six connexines), puis les connexons de cellules adjacentes s'unissent pour former des jonctions gap et ainsi permettre le couplage électrique entre les cellules cardiaques. Des auteurs ont démontré que le polymorphisme G-44A du promoteur du gène de la Cx40 constituait un facteur de risque important de FA.⁴⁹⁰ Ils ont réalisé une étude sur 30 patients souffrant de tachycardies supraventriculaires mais n'ayant aucune maladie cardiaque structurale et qui devaient subir une chirurgie cardiaque (catheter ablation). De ceux-ci, 14 avaient déjà eu des épisodes sporadiques de FA paroxystique. L'étude consistait à mesurer la vulnérabilité des oreillettes à l'aide d'un protocole de stimulation auriculaire permettant d'induire la FA, après quoi les intervalles fibrillatoires ont été calculés à chaque site d'induction. Les intervalles fibrillatoires moyens ont ensuite été déterminés pour chacun des sites et ont servi d'indice de période réfractaire locale. Enfin, la moyenne et la déviation standard de ces indices ont été déterminées. Les auteurs ont par la suite calculé le coefficient de dispersion de la repolarisation. Ce dernier se définit comme étant la déviation standard de tous les intervalles fibrillatoires moyens locaux, exprimée en pourcentage de l'intervalle moyen global de fibrillation. Un coefficient de dispersion de 3,0 ou moins était considéré normal. Des études de génotypage ont démontré que le génotype -44AA était associé à un coefficient de dispersion significativement plus élevé ($6,37 \pm 1,21$ par rapport à $2,38 \pm 0,39$ pour le génotype -44GG, $p=0,018$). Par ailleurs, la FA était beaucoup plus facile à induire chez les patients ayant le génotype -44AA. Une association entre l'allèle -44A et la FA idiopathique a également été démontrée parmi les 14 patients ayant déjà eu des épisodes de FA avant le début de cette étude.⁴⁹⁰ Cette étude fournit une piste très intéressante dans la compréhension des mécanismes génétiques régissant la FA, mais elle a cependant certaines limites non négligeables. Premièrement, un groupe de seulement 30 patients a été

analysé, ce qui est très peu. Deuxièmement, le lien entre la facilité d'induction de la FA et l'allèle -44AA est basé sur seulement 7 patients dont certains avaient déjà eu des épisodes de FA par le passé, ce qui est reconnu pour faciliter le développement d'arythmies auriculaires.

Une autre étude a mis en évidence que le polymorphisme -44A du gène de la Cx40 était lié à +71G et -44G, à +71A.⁴⁹¹ Cette même étude a démontré, parmi 173 patients atteints de FA et 232 patients contrôles, une plus forte prévalence de l'haplotype Cx40 (-44A, +71G) parmi les patients souffrant de FA. La présence de cet haplotype diminuait par ailleurs l'activité du promoteur de façon significative, lorsqu'exprimé dans une lignée de myocytes auriculaires de souris.⁴⁹¹ Or, il a été démontré qu'une moins forte expression de la Cx40 favorisait la vulnérabilité auriculaire et la propension aux arythmies chez la souris.^{492, 493} Une diminution d'expression de la Cx40 a aussi été identifiée en présence de FA chez l'humain.³⁷²

Des mutations somatiques dans la Cx40 ont aussi été identifiées récemment par Gollob *et al.*⁴⁹⁴ De telles mutations sont retrouvées au niveau tissulaire mais pas dans l'ADN extrait des lymphocytes. Parmi un groupe de 15 patients atteints de FA idiopathique et ayant subi un isolement chirurgical des veines pulmonaires, les mutations Pro88Ser et Gly38Asp-Met163Val ont été identifiées à l'état somatique chez respectivement deux et un patients. Elles se situent dans les premier (Gly38Asp), deuxième (Pro88Ser) et troisième (Met163Val) segments transmembranaires de la Cx40. Alors que Met163Val n'affecte pas le couplage intercellulaire, Gly38Asp et Pro88Ser provoquent une rétention intracellulaire de la Cx40, inhibant ainsi le couplage électrique. La mutation Ala96Ser (deuxième segment transmembranaire) a quant à elle été retrouvée à l'état germinale chez un quatrième patient, démontrant très peu ou pas de couplage intercellulaire comparativement à la protéine sauvage. Ces mutations pourraient donc entraîner une hétérogénéité dans la repolarisation et ainsi établir des réentrées.⁴⁹⁴ Malgré le nombre restreint de patients analysés, cette étude constitue une autre mise en évidence que la Cx40 est impliquée dans le développement de la FA. Il est cependant difficile d'imaginer comment les auteurs ont pu identifier ces mutations chez 4 patients parmi un groupe de seulement 15...

Des polymorphismes dans les gènes du système rénine-angiotensine auriculaire ont aussi été associés à la FA au cours des dernières années, bien que les mécanismes d'action en cause n'aient pas été identifiés.⁴⁹⁵ L'activation de ce système semble être un médiateur de la FA chez l'humain.⁴⁹⁶ L'angiotensine II agit sur la prolifération des fibroblastes et sur l'hypertrophie des myocytes cardiaques,⁴⁹⁷ d'où son lien potentiel avec le développement de la FA. Tsai *et al.*⁴⁹⁵ ont démontré, parmi 500 patients dont 250 étaient atteints de FA, que le polymorphisme M235T de l'exon 2 du gène de l'angiotensine ainsi que les polymorphismes G-6A et G-217A de la région promotrice de ce gène étaient significativement plus répandus parmi les patients atteints de FA.⁴⁹⁵

Ensuite, le polymorphisme TaqIB du gène codant pour la protéine CETP (cholesteryl ester transfer protein) a été associé à la FA de façon dominante, chez des patients souffrant d'ischémie cardiaque, d'albuminurie, de dysfonction rénale ou présentant un niveau sanguin élevé de protéine C réactive.⁴⁹⁸ Le rôle de la protéine CETP est de transférer les cholesteryl-esters du HDL vers le LDL et ainsi, de faire diminuer le mauvais cholestérol (HDL).⁴⁹⁹ Une diminution de l'activité de cette protéine prévient l'oxydation du LDL et diminue l'inflammation des parois vasculaires⁵⁰⁰ alors qu'une augmentation de son activité augmente le risque cardiovasculaire chez les patients ayant un haut niveau sanguin de triglycérides.⁵⁰¹ Des études récentes suggèrent que des polymorphismes dans la protéine CETP pourraient être associés à des maladies coronaires et à l'hypertension,^{502, 503} d'importants facteurs de risque de FA.

Enfin, une autre étude a rapporté une association entre les polymorphismes S38G du gène *minK* et T-786C de *eNOS* et la FA en comparant les génotypes de 331 patients Italiens atteints de FA et 441 contrôles.⁵⁰⁴ Le gène *minK* code pour la protéine MinK, sous-unité β du canal potassique responsable du courant I_{Ks} (KvLQT1). L'allèle 38G avait également été associé à la FA chez des patients Taiwanais.⁵⁰⁵ Suite à son expression dans des cellules CHO, cette allèle a démontré une réduction du courant I_{Ks} , possiblement due à une diminution de l'expression de KvLQT1 à la surface cellulaire.⁵⁰⁶ Pour ce qui est du gène *eNOS*, il code pour la nitric oxide synthase endothéliale (eNOS). L'allèle C du polymorphisme T-786C de *eNOS* est très rare et elle réduit considérablement l'activité du

promoteur.⁵⁰⁷ Or, une diminution des niveaux d'oxide nitrique augmente le courant $I_{Ca,L}$, ce qui peut contribuer au développement de la FA.⁵⁰⁸

Pour ce qui est du gène *hKv1.5*, peu de polymorphismes y ont été rapportés mais aucun n'a été relié à la FA. Récemment, Simard *et al.*¹⁶⁸ ont séquencé ce gène chez 190 patients, dont 95 Caucasiens, 65 de race noire et 30 Asiatiques, et ils y ont identifié 11 polymorphismes. Six de ceux-ci ont entraîné un changement dans la séquence peptidique du canal, soient A115V, A251T, P307S, P310L, P532L et R578K. Le polymorphisme A115V est situé dans l'extrémité NH₂-terminale, A251T est dans le segment transmembranaire S1, P307S et P310L se trouvent dans la boucle extracellulaire reliant S1 et S2 et P532L et R578K sont situés dans l'extrémité COOH-terminale.¹⁶⁸ Au niveau des caractéristiques électrophysiologiques de ces polymorphismes, seuls P532L et R578K ont montré quelques différences significatives par rapport au canal hKv1.5 sauvage: P532L avait une constante de temps rapide de désactivation plus faible à +50 mV alors que le voltage de demi-activation de R578K était plus élevé. Par ailleurs, l'IC₅₀ de ces variants à la quinidine était plus élevée.¹⁶⁸ La quinidine est un isomère de la quinine qui diminue l'excitabilité et la période réfractaire du myocarde et ralentit la conduction. Selon un algorithme de prédiction de structure secondaire, le polymorphisme P532L occasionnerait la formation d'une hélice α dans l'extrémité COOH-terminale, qui rendrait le canal résistant à la quinidine.⁵⁰⁹

3.9 Problématique, hypothèses et objectifs de recherche

Bien que la FA soit responsable d'une morbidité et d'un coût médical considérables, notre compréhension de cette pathologie et de son traitement demeurent insatisfaisants. Par ailleurs, le remodelage auriculaire électrique et structural qui lui est propre nous informe sur des facteurs pouvant potentiellement entretenir cette forme d'arythmie, mais la littérature actuelle contient relativement peu d'information sur les causes de son initiation. Ensuite, il est connu depuis un bon nombre d'années qu'une composante multigénique est impliquée dans le développement de la FA. Cependant, la plupart des gènes qui ont jusqu'à

présent été reliés à la FA sont également impliqués dans le développement d'autres maladies telles le SQTS et l'insuffisance cardiaque.

Étant donné que la FA est attribuable entre autre à un raccourcissement de la phase de plateau du potentiel d'action de l'oreillette¹ et que le courant I_{Kur} joue un rôle important dans la repolarisation auriculaire,¹⁴⁴ nous avons émis l'hypothèse que le canal potassique hKv1.5 pourrait être impliqué dans le développement de cette pathologie. Le courant I_{Kur} est d'ailleurs considéré comme étant particulièrement arythmogène, puisqu'il s'inactive très peu.²⁴¹ Sa rapidité d'activation, de réactivation et de désactivation font en sorte qu'il peut potentiellement être impliqué dans des arythmies auriculaires. Plus spécifiquement, les hypothèses du projet de recherche faisant l'objet de cette thèse étaient les suivantes:

- 1) Il existe des mutations dans le gène *hKv1.5* chez des patients atteints de FA.
- 2) Ces mutations modifient les cinétiques et/ou l'amplitude du courant I_{Kur} et tendent à raccourcir la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire efficace dans l'oreillette.
- 3) Ces mutations sont impliquées dans la pathogenèse de la FA familiale et idiopathique et elles peuvent prédisposer à la FA post-opératoire.

Les objectifs de recherche étaient les suivants, soient :

- 1) Identifier, à l'aide des techniques de réaction en chaîne de la polymérase et de séquençage automatique, des mutations dans le gène *hKv1.5* de patients atteints de FA familiale, idiopathique ou post-opératoire.
- 2) Reproduire ces mutations par mutagenèse dirigée et les exprimer dans un système hétérologue (lignées de cellules CHO et HEK) à l'aide de la technique de transfection au phosphate de calcium.
- 3) Évaluer les effets de ces mutations sur les propriétés électrophysiologiques du canal hKv1.5 en utilisant la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.
- 4) Vérifier, à l'aide de tests statistiques, s'il y a un lien entre les mutations trouvées et l'incidence de la FA post-opératoire.
- 5) Vérifier, à l'aide de tests statistiques, si ces mutations sont impliquées dans des cas de FA familiale.

Bibliographie

- (1) Katz AM. *Physiology of the heart*. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- (2) Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2708-12.
- (3) Bachmann G. The inter-auricular time interval. *Am J Physiol* 1916;41:309.
- (4) Wenckebach KF. Beitrage zur Kenntnis der menschlichen Herztätigkeit. *Arch Anat Physiol* 1907;1-2:1.
- (5) Wenckebach KF. Beitrage zur Kenntnis der menschlichen Herztätigkeit. *Arch Anat Physiol* 1908;3:53.
- (6) Thorel C. Vorläufige Mitteilung über eine besondere muskel verbindung zwischen der Cava superior und dem Hisschen Bündel. *München med Wchnschr* 1909;56:2159.
- (7) Thorel C. Über den Aufbau des Sinusknotens und seine Verbindung mit der Cava superior und den Wenckebachschen Bündeln. *München med Wchnschr* 1910;57:183.
- (8) Coraboeuf E, Weidmann S. Potentiel de repos et potentiel d'action du muscle cardiaque mesurés à l'aide de microélectrodes intracellulaires. *C R Soc Biol , Paris* 1949;143:1329-31.
- (9) Coraboeuf E, Weidmann S. Potentiels d'action du muscle cardiaque obtenus à l'aide de microélectrodes intracellulaires. Présence d'une inversion de potentiel. *C R Soc Biol , Paris* 1949;143:1360-1.
- (10) Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952;117(4):500-44.
- (11) Singer DH, Baumgarten CM, Ten Eick RE. Cellular electrophysiology of ventricular and other dysrhythmias: studies on diseased and ischemic heart. *Prog Cardiovasc Dis* 1981;24(2):97-156.
- (12) Spach MS, Heidlage JF, Darken ER, Hofer E, Raines KH, Starmer CF. Cellular Vmax reflects both membrane properties and the load presented by adjoining cells. *Am J Physiol* 1992;263(6 Pt 2):H1855-H1863.
- (13) Fozzard HA. Cardiac muscle: excitability and passive electrical properties. *Prog Cardiovasc Dis* 1977;19(5):343-59.

- (14) Dewey MM, Barr L. Intercellular connections between smooth muscle cells: The nexus. *Science* 1962;137:670-2.
- (15) Hodgkin AL. The conduction of the nervous impulse. 1971. Liverpool, Liverpool University Press. Ref Type: Generic.
- (16) Marey EJ. Des excitations électriques de coeur. *Physiol Exp* 1876;63-86.
- (17) Adrian ED, Lucas K. On the summation of propagated disturbances in nerve and muscle. *J Physiol (Lond)* 1912;44:68-124.
- (18) Adrian ED. The recovery process of excitable tissues. Part II. *J Physiol (Lond)* 1921;55:193-225.
- (19) Stockbridge N. Etiology of the supernormal period. *Biophys J* 1988;54(5):777-80.
- (20) Spear JF, Moore EN. Supernormal conduction in the canine bundle of His and proximal bundle branches. *Am J Physiol* 1980;238(3):H300-H306.
- (21) Osborn JJ. Experimental hypothermia; respiratory and blood pH changes in relation to cardiac function. *Am J Physiol* 1953;175(3):389-98.
- (22) Hlaing T, DiMino T, Kowey PR, Yan GX. ECG repolarization waves: their genesis and clinical implications. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2005;10(2):211-23.
- (23) Patel A, Getsos J. Images in clinical medicine. Osborn waves of hypothermia. *N Engl J Med* 1994;330(10):680.
- (24) Sridharan MR, Horan LG. Electrocardiographic J wave of hypercalcemia. *Am J Cardiol* 1984;54(6):672-3.
- (25) Gussak I, Bjerregaard P, Egan TM, Chaitman BR. ECG phenomenon called the J wave. History, pathophysiology, and clinical significance. *J Electrocardiol* 1995;28(1):49-58.
- (26) Ferst JA, Chaitman BR. The electrocardiogram and the athlete. *Sports Med* 1984;1(5):390-403.
- (27) Bjornstad H, Storstein L, Meen HD, Hals O. Electrocardiographic findings of repolarization in athletic students and control subjects. *Cardiology* 1994;84(1):51-60.
- (28) Bernstein J. Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen ströme. *Pflügers Arch ges Physiol* 1902;92:521-62.
- (29) Ling G, Gerard LW. The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J Cell Comp Physiol* 1949;34:407-12.

- (30) Curtis HJ, Cole KS. Membrane resting and action potentials from the squid giant axon. *J Cell & Comp Physiol* 1942;19:135.
- (31) Hodgkin AL, Huxley AF. Resting and action potentials in single nerve fibers. *J Physiol* 1945;104:176.
- (32) Hodgkin AL, Nastuk WL. Membrane potentials in single fibers of the frog's sartorius muscle. *J Physiol* 1949;108:42.
- (33) Woodbury LA, Woodbury JW, Hecht HH. Membrane resting and action potentials of single cardiac muscle fibers. *Circulation* 1950;1(2):264-6.
- (34) Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 1952;116(4):424-48.
- (35) Walker J. Intracellular inorganic ions in cardiac tissue. Fozzard H, Haber E, Katz Aeale, editors. In: *The heart and cardiovascular system*. 561-572. 1986. New-York, Raven Press. Ref Type: Generic.
- (36) Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*, 3rd edition. 2001. Sunderland, Mass., Sinauer Associates Inc. Ref Type: Generic.
- (37) Nernst W. Zur theorie des elektrischen reizes. *Arch Ges Physiol* 1908;122:275-314.
- (38) Gellens ME, George AL, Jr., Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL *et al*. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(2):554-8.
- (39) Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 1985;86(1):1-30.
- (40) Hiraoka M, Kawano S, Hirano Y, Furukawa T. Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1998;40(1):23-33.
- (41) Warth JD, Collier ML, Hart P, Geary Y, Gelband CH, Chapman T *et al*. CFTR chloride channels in human and simian heart. *Cardiovasc Res* 1996;31(4):615-24.
- (42) Duan DY, Liu LL, Bozeat N, Huang ZM, Xiang SY, Wang GL *et al*. Functional role of anion channels in cardiac diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(3):265-78.
- (43) Glitsch HG. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol Rev* 2001;81(4):1791-826.

- (44) Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 2):F633-F650.
- (45) Wang J, Schwinger RH, Frank K, Muller-Ehmsen J, Martin-Vasallo P, Pressley TA *et al*. Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the human heart. *J Clin Invest* 1996;98(7):1650-8.
- (46) Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev* 1999;79(3):917-1017.
- (47) Isenberg G, Trautwein W. The effect of dihydro-ouabain and lithium-ions on the outward current in cardiac Purkinje fibers. Evidence for electrogenicity of active transport. *Pflugers Arch* 1974;350(1):41-54.
- (48) Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 1968;195(2):451-70.
- (49) Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol* 1969;200(2):431-58.
- (50) Frank JS, Mottino G, Reid D, Molday RS, Philipson KD. Distribution of the Na⁺-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol* 1992;117(2):337-45.
- (51) Kieval RS, Bloch RJ, Lindenmayer GE, Ambesi A, Lederer WJ. Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *Am J Physiol* 1992;263(2 Pt 1):C545-C550.
- (52) Benardeau A, Hatem SN, Rucker-Martin C, Le GB, Mace L, Dervanian P *et al*. Contribution of Na⁺/Ca²⁺ exchange to action potential of human atrial myocytes. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 2):H1151-H1161.
- (53) Egan TM, Noble D, Noble SJ, Powell T, Spindler AJ, Twist VW. Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1989;411:639-61.
- (54) Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983;245(1):C1-14.
- (55) Bett G, Noble D, Noble S, Earm Y, Ho WK, So IS. Na-Ca exchange current during the cardiac action potential. *Adv Exp Med Biol* 1992;311:453-4.
- (56) Carmeliet E. Intracellular Ca²⁺ concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium* 2004;35(6):557-73.

- (58) Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1992;458:361-84.
- (59) Fliegel L, Frohlich O. The Na⁺/H⁺ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem J* 1993;296 (Pt 2):273-85.
- (60) Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orłowski J, Shrier A. Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 2):H709-H717.
- (61) Counillon L, Pouyssegur J. Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). *Cardiovasc Res* 1995;29(2):147-54.
- (62) Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na⁺-H⁺ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 1999;85(9):777-86.
- (63) Dyck JR, Maddaford TG, Pierce GN, Fliegel L. Induction of expression of the sodium-hydrogen exchanger in rat myocardium. *Cardiovasc Res* 1995;29(2):203-8.
- (64) Frohlich O, Karmazyn M. The Na-H exchanger revisited: an update on Na-H exchange regulation and the role of the exchanger in hypertension and cardiac function in health and disease. *Cardiovasc Res* 1997;36(2):138-48.
- (65) Siffert W, Akkerman JW. Na⁺/H⁺ exchange and Ca²⁺ influx. *FEBS Lett* 1989;259(1):1-4.
- (66) Clusin WT, Buchbinder M, Harrison DC. Calcium overload, "injury" current, and early ischaemic cardiac arrhythmias--a direct connection. *Lancet* 1983;1(8319):272-4.
- (67) Janke J, Fleckenstein A, Doring HJ, Leder O. [Key-role of intracellular calcium overload in acute necrosis of the myocardium. Cardioprotection with verapamil]. *Minerva Med* 1975;66(38):1846-58.
- (68) Fozzard HA. Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res* 2002;55(1):1-8.
- (69) Sakakibara Y, Wasserstrom JA, Furukawa T, Jia H, Arentzen CE, Hartz RS *et al.* Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circ Res* 1992;71(3):535-46.
- (70) Verheijck EE, van Ginneken AC, Wilders R, Bouman LN. Contribution of L-type Ca²⁺ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 2):H1064-H1077.

- (71) Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J *et al.* Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5543-8.
- (72) Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H, Owen JM. Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am J Physiol* 1997;272(6 Pt 2):H2793-H2806.
- (73) Marbán E, O'Rourke B. Calcium channels: structure, function and regulation. In: *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside.* 11-21. 1995. Philadelphia, PA: Saunders, D. P. Zipes and J. Jalife. Ref Type: Generic.
- (74) Nerbonne JM, Kass RS. Physiology and molecular biology of ion channels contributing to ventricular repolarization. *Contemporary Cardiology: Cardiac Repolarization: Bridging Basic and Clinical Science.* 25-62. 2003. Totowa, NJ: Humana, I. Gussak and C. Antzelevitch. Ref Type: Generic.
- (75) Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu Rev Physiol* 1996;58:363-94.
- (76) Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999;113(5):661-78.
- (77) Näbauer M, Barth A, Kääh S. A second calcium-independent transient outward current present in human ventricular myocardium. *Circulation* 1998;98:1-231.
- (78) Zygmunt AC, Gibbons WR. Properties of the calcium-activated chloride current in heart. *J Gen Physiol* 1992;99(3):391-414.
- (79) Zygmunt AC. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1994;267(5 Pt 2):H1984-H1995.
- (80) Dudel J, Peper K, Rudel R, Trautwein W. The dynamic chloride component of membrane current in Purkinje fibers. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1967;295(3):197-212.
- (81) Zygmunt AC, Gibbons WR. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1991;68(2):424-37.
- (82) Collier ML, Levesque PC, Kenyon JL, Hume JR. Unitary Cl⁻ channels activated by cytoplasmic Ca²⁺ in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78(5):936-44.
- (83) Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999;42(2):339-60.

- (84) Benitah JP, Gomez AM, Fauconnier J, Kerfant BG, Perrier E, Vassort G *et al.* Voltage-gated Ca^{2+} currents in the human pathophysiologic heart: a review. *Basic Res Cardiol* 2002;97 Suppl 1:I111-I118.
- (85) Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 1979;41:473-84.
- (86) Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;260(2 Pt 2):H393-H399.
- (87) Horie M, Hayashi S, Kawai C. Two types of delayed rectifying K^+ channels in atrial cells of guinea pig heart. *Jpn J Physiol* 1990;40(4):479-90.
- (88) Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external Ca^{2+} and K^+ in gating of cardiac delayed rectifier K^+ currents. *Pflugers Arch* 1992;420(2):180-6.
- (89) Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K^+ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78(4):689-96.
- (90) Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;149(2):133-42.
- (91) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;28(10):1540-6.
- (92) Liu DW, Antzelevitch C. Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res* 1995;76(3):351-65.
- (93) Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 2):H2157-H2168.
- (94) Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A *et al.* Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I_{Kr} channels. *J Biol Chem* 2000;275(8):5997-6006.
- (95) Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 2):H1717-H1725.
- (96) Findlay I. The ATP sensitive potassium channel of cardiac muscle and action potential shortening during metabolic stress. *Cardiovasc Res* 1994;28(6):760-1.

- (97) Isomoto S, Kurachi Y. Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1997;8(12):1431-46.
- (98) Heidbuchel H, Vereecke J, Carmeliet E. Three different potassium channels in human atrium. Contribution to the basal potassium conductance. *Circ Res* 1990;66(5):1277-86.
- (99) Dobrzynski H, Janvier NC, Leach R, Findlay JB, Boyett MR. Effects of ACh and adenosine mediated by Kir3.1 and Kir3.4 on ferret ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(2):H615-H630.
- (100) Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I_{K1}. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(4):625-38.
- (101) Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85(4):1205-53.
- (102) Miake J, Marban E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest* 2003;111(10):1529-36.
- (103) Morad M, Tung L. Ionic events responsible for the cardiac resting and action potential. *Am J Cardiol* 1982;49(3):584-94.
- (104) Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* 1998;98(22):2422-8.
- (105) Noma A, Nakayama T, Kurachi Y, Irisawa H. Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit. *Jpn J Physiol* 1984;34(2):245-54.
- (106) Ravens U, Dobrev D. Cardiac sympathetic innervation and control of potassium channel function. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35(2):137-9.
- (107) Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;42(2):377-90.
- (108) DiFrancesco D. The pacemaker current (I_f) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 1995;30(2):307-8.
- (109) Verheijck EE, Wilders R, Bouman LN. Atrio-sinus interaction demonstrated by blockade of the rapid delayed rectifier current. *Circulation* 2002;105(7):880-5.
- (110) Hille B. Ionic channels of excitable membranes. 1992. Sunderland, Mass., Sinauer Associates Inc. Ref Type: Generic.

- (111) Vega-Saenz de Miera E, Weiser M, Kentros C, Lau D, Moreno H, Serodio P *et al.* Membrane channels: molecular and cellular physiology. Shaw-related K⁺ channels in mammals. 41-78. 1994. San Diego, C. Peracchia. Academic Press. Ref Type: Generic.
- (112) Fedida D, Chen FS, Zhang X. The 1997 Stevenson Award Lecture. Cardiac K⁺ channel gating: cloned delayed rectifier mechanisms and drug modulation. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76(2):77-89.
- (113) Jaslove SW, Brink PR. The mechanism of rectification at the electrotonic motor giant synapse of the crayfish. *Nature* 1986;323(6083):63-5.
- (114) Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S *et al.* Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 1993;73(1):210-6.
- (115) Fedida D, Hesketh JC. Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2001;75(3):165-99.
- (116) The IUPHAR compendium of voltage-gated ion channels. Catterall WA, Chandy KG, Gutman GA, editors. 60. 2002. Newark Close, Royston, IUPHAR Media. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (117) Albrecht B, Weber K, Pongs O. Characterization of a voltage-activated K-channel gene cluster on human chromosome 12p13. *Receptors Channels* 1995;3(3):213-20.
- (118) Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM. Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J* 1991;5(3):331-7.
- (119) Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991;349(6307):305-10.
- (120) Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994;66(4):1061-7.
- (121) Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH *et al.* Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J* 1988;7(4):1087-96.
- (122) Li M, Unwin N, Stauffer KA, Jan YN, Jan LY. Images of purified Shaker potassium channels. *Curr Biol* 1994;4(2):110-5.
- (123) MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;350(6315):232-5.

- (124) Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA, Tagliatela M, Joho RH, Brown AM. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science* 1991;251(4996):942-4.
- (125) Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 1991;251(4996):939-42.
- (126) Yool AJ, Schwarz TL. Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991;349(6311):700-4.
- (127) Holmgren M, Jurman ME, Yellen G. N-type inactivation and the S4-S5 region of the Shaker K⁺ channel. *J Gen Physiol* 1996;108(3):195-206.
- (128) Kirsch GE, Shieh CC, Drewe JA, Vener DF, Brown AM. Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron* 1993;11(3):503-12.
- (129) Lopez GA, Jan YN, Jan LY. Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore. *Nature* 1994;367(6459):179-82.
- (130) Shieh CC, Kirsch GE. Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K⁺ channels. *Biophys J* 1994;67(6):2316-25.
- (131) Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003;423(6935):33-41.
- (132) Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R. Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003;422(6928):180-5.
- (133) Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003;423(6935):42-8.
- (134) Kurata HT, Soon GS, Fedida D. Altered state dependence of c-type inactivation in the long and short forms of human Kv1.5. *J Gen Physiol* 2001;118(3):315-32.
- (135) Strang C, Cushman SJ, DeRubeis D, Peterson D, Pfaffinger PJ. A central role for the T1 domain in voltage-gated potassium channel formation and function. *J Biol Chem* 2001;276(30):28493-502.
- (136) Shen NV, Pfaffinger PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron* 1995;14(3):625-33.

- (137) Kurata HT, Soon GS, Eldstrom JR, Lu GW, Steele DF, Fedida D. Amino-terminal determinants of U-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* 2002;277(32):29045-53.
- (138) Choe S, Kreuzsch A, Pfaffinger PJ. Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels. *Trends Biochem Sci* 1999;24(9):345-9.
- (139) Miller C. 1990: annus mirabilis of potassium channels. *Science* 1991;252(5010):1092-6.
- (140) Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. *J Gen Physiol* 1994;103(2):249-78.
- (141) Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol* 1994;103(2):321-62.
- (142) Zagotta WN, Hoshi T, Dittman J, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J Gen Physiol* 1994;103(2):279-319.
- (143) Stefani E, Toro L, Perozo E, Bezanilla F. Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys J* 1994;66(4):996-1010.
- (144) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;73(6):1061-76.
- (145) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ Res* 1993;73(2):276-85.
- (146) Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997;80(4):572-9.
- (147) Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;101(4):513-43.
- (148) Caouette D, Dongmo C, Berube J, Fournier D, Daleau P. Hydrogen peroxide modulates the Kv1.5 channel expressed in a mammalian cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368(6):479-86.
- (149) Perozo E, Santacruz-Toloza L, Stefani E, Bezanilla F, Papazian DM. S4 mutations alter gating currents of Shaker K channels. *Biophys J* 1994;66(2 Pt 1):345-54.

- (150) Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY. Transmembrane movement of the shaker K^+ channel S4. *Neuron* 1996;16(2):387-97.
- (151) Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K^+ channel. *Nature* 1991;353(6346):752-6.
- (152) Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 1992;255(5052):1712-5.
- (153) Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW. Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol* 1998;111(3):421-39.
- (154) Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW. Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol* 1998;111(3):399-420.
- (155) Mannuzzu LM, Moronne MM, Isacoff EY. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 1996;271(5246):213-6.
- (156) Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, Yellen G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K^+ channel. *Neuron* 1997;19(1):175-84.
- (157) Yellen G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* 1998;31(3):239-95.
- (158) Rich TC, Yeola SW, Tamkun MM, Snyders DJ. Mutations throughout the S6 region of the hKv1.5 channel alter the stability of the activation gate. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(1):C161-C171.
- (159) Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated K^+ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995;69(3):896-903.
- (160) Ogielska EM, Aldrich RW. A mutation in S6 of Shaker potassium channels decreases the K^+ affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore. *J Gen Physiol* 1998;112(2):243-57.
- (161) Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker K^+ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 1991;7(4):547-56.
- (162) Liu Y, Jurman ME, Yellen G. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K^+ channel during gating. *Neuron* 1996;16(4):859-67.
- (163) Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990;250(4980):533-8.

- (164) Kiss L, LoTurco J, Korn SJ. Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J* 1999;76(1 Pt 1):253-63.
- (165) Loots E, Isacoff EY. Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K⁺ channel. *J Gen Physiol* 1998;112(4):377-89.
- (166) Klemic KG, Kirsch GE, Jones SW. U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels. *Biophys J* 2001;81(2):814-26.
- (167) Fedida D, Maruoka ND, Lin S. Modulation of slow inactivation in human cardiac Kv1.5 channels by extra- and intracellular permeant cations. *J Physiol* 1999;515 (Pt 2):315-29.
- (168) Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K⁺ channel gene KCNA5. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77(3):138-44.
- (169) Sewing S, Roeper J, Pongs O. Kvβ1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel α subunits. *Neuron* 1996;16(2):455-63.
- (170) Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kvβ1 subunits. *J Biol Chem* 1996;271(45):28311-7.
- (171) Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvβ2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;271(5):2406-12.
- (172) England SK, Uebele VN, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. A novel K⁺ channel β-subunit (hKvβ1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 1995;270(48):28531-4.
- (173) England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated K⁺ channel β subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(14):6309-13.
- (174) Bezanilla F, Perozo E, Papazian DM, Stefani E. Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science* 1991;254(5032):679-83.
- (175) Fedida D, Bouchard R, Chen FS. Slow gating charge immobilization in the human potassium channel Kv1.5 and its prevention by 4-aminopyridine. *J Physiol* 1996;494 (Pt 2):377-87.
- (176) Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996;78(5):903-15.

- (177) Fink M, Duprat F, Lesage F, Heurteaux C, Romey G, Barhanin J *et al.* A new K⁺ channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem* 1996;271(42):26341-8.
- (178) Eldstrom J, Choi WS, Steele DF, Fedida D. SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett* 2003;547(1-3):205-11.
- (179) Li H, Guo W, Mellor RL, Nerbonne JM. KChIP2 modulates the cell surface expression of Kv1.5-encoded K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(1):121-32.
- (180) Lindemann JP, Watanabe AM. Cardiac Electrophysiology, From Cell to Bedside. Sympathetic control of cardiac electrical activity. 277-283. 1990. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co, Zipes DP, Jalife J, eds. Ref Type: Generic
- (181) Fedida D, Braun AP, Giles WR. α 1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiol Rev* 1993;73(2):469-87.
- (182) Williams CP, Hu N, Shen W, Mashburn AB, Murray KT. Modulation of the human Kv1.5 channel by protein kinase C activation: role of the Kv β 1.2 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(2):545-50.
- (183) Kwak YG, Hu N, Wei J, George AL, Jr., Grobaski TD, Tamkun MM *et al.* Protein kinase A phosphorylation alters Kv β 1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 1999;274(20):13928-32.
- (184) Holmes TC, Fadool DA, Ren R, Levitan IB. Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* 1996;274(5295):2089-91.
- (185) Hershman KM, Levitan ES. RPTPmu and protein tyrosine phosphorylation regulate K⁺ channel mRNA expression in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278(2):C397-C403.
- (186) Brady-Kalnay SM, Tonks NK. Identification of the homophilic binding site of the receptor protein tyrosine phosphatase PTP mu. *J Biol Chem* 1994;269(45):28472-7.
- (187) Gebbink MF, van E, I, Hateboer G, Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA *et al.* Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett* 1991;290(1-2):123-30.

- (188) Gebbink MF, Zondag GC, Koningstein GM, Feiken E, Wubbolts RW, Moolenaar WH. Cell surface expression of receptor protein tyrosine phosphatase RPTP μ is regulated by cell-cell contact. *J Cell Biol* 1995;131(1):251-60.
- (189) Axford TC, Dearani JA, Khait I, Park WM, Patel MA, Doursounian M *et al*. Electrode-derived myocardial pH measurements reflect intracellular myocardial metabolism assessed by phosphorus 31-nuclear magnetic resonance spectroscopy during normothermic ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103(5):902-6.
- (190) Steidl JV, Yool AJ. Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Mol Pharmacol* 1999;55(5):812-20.
- (191) Jager H, Grissmer S. Regulation of a mammalian Shaker-related potassium channel, hKv1.5, by extracellular potassium and pH. *FEBS Lett* 2001;488(1-2):45-50.
- (192) Kehl SJ, Eduljee C, Kwan DC, Zhang S, Fedida D. Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn²⁺. *J Physiol* 2002;541(Pt 1):9-24.
- (193) Deutsch N, Matsuoka S, Weiss JN. Surface charge and properties of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *J Gen Physiol* 1994;104(4):773-800.
- (194) Kozak JA, Matsushita M, Nairn AC, Cahalan MD. Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *J Gen Physiol* 2005;126(5):499-514.
- (195) Bérubé J, Chahine M, Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflugers Arch* 1999;438(3):419-22.
- (196) Hecht HH, Hutter OF. Action of pH on cardiac Purkinje fibers. Taccardi B, Marchetti Ge, editors. In *Electrophysiology of the heart*. 105-123. 1965. Oxford, Pergamon Press. Ref Type: Generic.
- (197) Vaughan Williams EM, Whyte JM. Chemosensitivity of cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* 1967;189:119-37.
- (198) Coraboeuf E, Deroubaix E, Hoerter J. Control of ionic permeabilities in normal and ischemic heart. *Circ Res* 1976;38(5 Suppl 1):I92-I98.
- (199) Fry CH, Poole-Wilson PA. Effects of acid-base changes on excitation-contraction coupling in guinea-pig and rabbit cardiac ventricular muscle. *J Physiol* 1981;313:141-60.

- (200) Bethell HW, Vandenberg JI, Smith GA, Grace AA. Changes in ventricular repolarization during acidosis and low-flow ischemia. *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 2):H551-H561.
- (201) Wang Z, Zhang X, Fedida D. Gating current studies reveal both intra- and extracellular cation modulation of K⁺ channel deactivation. *J Physiol* 1999;515 (Pt 2):331-9.
- (202) Perozo E, MacKinnon R, Bezanilla F, Stefani E. Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron* 1993;11(2):353-8.
- (203) Zhang S, Kehl SJ, Fedida D. Modulation of Kv1.5 potassium channel gating by extracellular zinc. *Biophys J* 2001;81(1):125-36.
- (204) Zhang S, Kwan DC, Fedida D, Kehl SJ. External K⁺ relieves the block but not the gating shift caused by Zn²⁺ in human Kv1.5 potassium channels. *J Physiol* 2001;532(Pt 2):349-58.
- (205) Perchenet L, Clement-Chomienne O. External nickel blocks human Kv1.5 channels stably expressed in CHO cells. *J Membr Biol* 2001;183(1):51-60.
- (206) Kwan DC, Eduljee C, Lee L, Zhang S, Fedida D, Kehl SJ. The external K⁺ concentration and mutations in the outer pore mouth affect the inhibition of Kv1.5 current by Ni²⁺. *Biophys J* 2004;86(4):2238-50.
- (207) Tammaro P, Smirnov SV, Moran O. Effects of intracellular magnesium on Kv1.5 and Kv2.1 potassium channels. *Eur Biophys J* 2005;34(1):42-51.
- (208) Persad S, Rupp H, Jindal R, Arneja J, Dhalla NS. Modification of cardiac beta-adrenoceptor mechanisms by H₂O₂. *Am J Physiol* 1998;274(2 Pt 2):H416-H423.
- (209) Mason HS, Latten MJ, Godoy LD, Horowitz B, Kenyon JL. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol Pharmacol* 2002;61(2):285-93.
- (210) Duprat F, Guillemare E, Romey G, Fink M, Lesage F, Lazdunski M *et al.* Susceptibility of cloned K⁺ channels to reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(25):11796-800.
- (211) Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;89(5):437-44.
- (212) Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003;546(Pt 2):403-13.

- (213) Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 2005;65(1):148-57.
- (214) Stumpf WE. Steroid hormones and the cardiovascular system: direct actions of estradiol, progesterone, testosterone, gluco- and mineralcorticoids, and soltritol [vitamin D] on central nervous regulatory and peripheral tissues. *Experientia* 1990;46(1):13-25.
- (215) Litwack G, Schmidt TJ. Biochemistry of hormones II: Steroid hormone. Devlin TMed, editor. In Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. 893-918. 1997. Wiley-Liss, New York. Ref Type: Generic.
- (216) London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ *et al*. Targeted replacement of Kv1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of $I_{K,slow}$ and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circ Res* 2001;88(9):940-6.
- (217) Sheng Z, Deutsch C. Assembly of ion channels. *Methods Enzymol* 1998;293:17-32.
- (218) Griffith LC. Potassium channels: the importance of transport signals. *Curr Biol* 2001;11(6):R226-R228.
- (219) Zhu J, Watanabe I, Gomez B, Thornhill WB. Determinants involved in Kv1 potassium channel folding in the endoplasmic reticulum, glycosylation in the Golgi, and cell surface expression. *J Biol Chem* 2001;276(42):39419-27.
- (220) Li D, Takimoto K, Levitan ES. Surface expression of Kv1 channels is governed by a C-terminal motif. *J Biol Chem* 2000;275(16):11597-602.
- (221) Choi WS, Khurana A, Mathur R, Viswanathan V, Steele DF, Fedida D. Kv1.5 surface expression is modulated by retrograde trafficking of newly endocytosed channels by the dynein motor. *Circ Res* 2005;97(4):363-71.
- (222) Valetti C, Wetzel DM, Schrader M, Hasbani MJ, Gill SR, Kreis TE *et al*. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* 1999;10(12):4107-20.
- (223) Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 2000;14(2):231-41.
- (224) Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 5):987-98.

- (225) Tiffany AM, Manganas LN, Kim E, Hsueh YP, Sheng M, Trimmer JS. PSD-95 and SAP97 exhibit distinct mechanisms for regulating K⁺ channel surface expression and clustering. *J Cell Biol* 2000;148(1):147-58.
- (226) Kim E, Sheng M. Differential K⁺ channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases. *Neuropharmacology* 1996;35(7):993-1000.
- (227) Murata M, Buckett PD, Zhou J, Brunner M, Folco E, Koren G. SAP97 interacts with Kv1.5 in heterologous expression systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(6):H2575-H2584.
- (228) Mathur R, Choi WS, Eldstrom J, Wang Z, Kim J, Steele DF *et al.* A specific N-terminal residue in Kv1.5 is required for upregulation of the channel by SAP97. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(1):1-8.
- (229) Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM, McKinnon D. Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J Physiol* 2003;548(Pt 3):815-22.
- (230) Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE, Trimmer JS. β subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* 1996;16(4):843-52.
- (231) Khanna R, Myers MP, Laine M, Papazian DM. Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 2001;276(36):34028-34.
- (232) Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kv β subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem* 2001;276(7):4839-44.
- (233) Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory Kv β 1 subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K⁺ channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005;96(4):451-8.
- (234) Kosolapov A, Deutsch C. Folding of the voltage-gated K⁺ channel T1 recognition domain. *J Biol Chem* 2003;278(6):4305-13.
- (235) Lu J, Robinson JM, Edwards D, Deutsch C. T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry* 2001;40(37):10934-46.
- (236) Robinson JM, Deutsch C. Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron* 2005;45(2):223-32.
- (237) Page RL, Roden DM. Drug therapy for atrial fibrillation: where do we go from here? *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(11):899-910.

- (238) Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channel for the treatment of atrial arrhythmias. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2003;1(3):273-87.
- (239) Yue L, Feng JL, Wang Z, Nattel S. Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2000;46(1):151-61.
- (240) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272(1):184-96.
- (241) Knobloch K, Brendel J, Rosenstein B, Bleich M, Busch AE, Wirth KJ. Atrial-selective antiarrhythmic actions of novel I_{Kur} vs. I_{Kr} , I_{Ks} , and I_{KAch} class Ic drugs and β -blockers in pigs. *Med Sci Monit* 2004;10(7):BR221-BR228.
- (242) Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF *et al*. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet* 1996;348(9019):7-12.
- (243) Torp-Pedersen C, Moller M, Bloch-Thomsen PE, Kober L, Sandoe E, Egstrup K *et al*. Dofetilide in patients with congestive heart failure and left ventricular dysfunction. Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality on Dofetilide Study Group. *N Engl J Med* 1999;341(12):857-65.
- (244) Singh S, Zoble RG, Yellen L, Brodsky MA, Feld GK, Berk M *et al*. Efficacy and safety of oral dofetilide in converting to and maintaining sinus rhythm in patients with chronic atrial fibrillation or atrial flutter: the symptomatic atrial fibrillation investigative research on dofetilide (SAFIRE-D) study. *Circulation* 2000;102(19):2385-90.
- (245) Bachmann A, Gutcher I, Kopp K, Brendel J, Bosch RF, Busch AE *et al*. Characterization of a novel Kv1.5 channel blocker in *Xenopus* oocytes, CHO cells, human and rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;364(5):472-8.
- (246) Hohnloser SH, Dorian P, Straub M, Beckmann K, Kowey P. Safety and efficacy of intravenously administered tedisamil for rapid conversion of recent-onset atrial fibrillation or atrial flutter. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(1):99-104.
- (247) Jost N, Virag L, Hala O, Varro A, Thormahlen D, Papp JG. Effect of the antifibrillatory compound tedisamil (KC-8857) on transmembrane currents in mammalian ventricular myocytes. *Curr Med Chem* 2004;11(24):3219-28.
- (248) Caballero R, Gomez R, Nunez L, Moreno I, Tamargo J, Delpon E. Diltiazem inhibits hKv1.5 and Kv4.3 currents at therapeutic concentrations. *Cardiovasc Res* 2004;64(3):457-66.

- (249) Rampe D, Wible B, Fedida D, Dage RC, Brown AM. Verapamil blocks a rapidly activating delayed rectifier K^+ channel cloned from human heart. *Mol Pharmacol* 1993;44(3):642-8.
- (250) Zhang X, Anderson JW, Fedida D. Characterization of nifedipine block of the human heart delayed rectifier, hKv1.5. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281(3):1247-56.
- (251) Gogelein H, Brendel J, Steinmeyer K, Strubing C, Picard N, Rampe D *et al.* Effects of the atrial antiarrhythmic drug AVE0118 on cardiac ion channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;370(3):183-92.
- (252) Wirth KJ, Paehler T, Rosenstein B, Knobloch K, Maier T, Frenzel J *et al.* Atrial effects of the novel K^+ -channel-blocker AVE0118 in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res* 2003;60(2):298-306.
- (253) Knobloch K, Brendel J, Peukert S, Rosenstein B, Busch AE, Wirth KJ. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I_{Kur} channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I_{Kr} blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and ibutilide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002;366(5):482-7.
- (254) Nagasawa H, Fujiki A, Fujikura N, Matsuda T, Yamashita T, Inoue H. Effects of a novel class III antiarrhythmic agent, NIP-142, on canine atrial fibrillation and flutter. *Circ J* 2002;66(2):185-91.
- (255) Matsuda T, Masumiya H, Tanaka N, Yamashita T, Tsuruzoe N, Tanaka Y *et al.* Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K^+ channel Kv1.5 current. *Life Sci* 2001;68(17):2017-24.
- (256) Goldstein RN, Khrestian C, Carlsson L, Waldo AL. AZD7009: a new antiarrhythmic drug with predominant effects on the atria effectively terminates and prevents reinduction of atrial fibrillation and flutter in the sterile pericarditis model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15(12):1444-50.
- (257) Stump GL, Wallace AA, Regan CP, Lynch JJ, Jr. In vivo antiarrhythmic and cardiac electrophysiologic effects of a novel diphenylphosphine oxide I_{Kur} blocker (2-isopropyl-5-methylcyclohexyl) diphenylphosphine oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315(3):1362-7.
- (258) Lagrutta A, Fermini B, Salata J. Novel potent inhibitors of cloned Kv1.5 potassium channels and human I_{Kur} . *FASEB J* 2004;18:A1282.
- (259) Komatsu T, Nakamura S, Suzuki O, Yomogida K, Horiuchi D, Abe N *et al.* [Comparison of the efficacies of disopyramide, cibenzoline and aprindine for the termination of paroxysmal and persistent atrial fibrillation in elderly and non-elderly patients]. *J Cardiol* 2003;41(4):191-8.

- (260) Komatsu T, Nakamura S, Kimura M, Owada S, Saito E, Kobayashi T *et al.* [Efficacy of cibenzoline in the termination and long-term prevention of paroxysmal atrial fibrillation: analysis based on the time of onset]. *J Cardiol* 2001;37(2):75-82.
- (261) Yamashita T, Sekiguchi A, Iwasaki YK, Sagara K, Hatano S, Iinuma H *et al.* Cibenzoline attenuates upregulation of Kv1.5 channel gene expression by experimental paroxysmal atrial fibrillation. *Int Heart J* 2005;46(2):279-88.
- (262) Kimura T, But PPH, Guo JX, Sung CK. International Collation of Traditional and Folk Medicine, Part 1. 117-118. 1996. Singapore, World Scientific. Ref Type: Generic
- (263) Eun JS, Park JA, Choi BH, Cho SK, Kim DK, Kwak YG. Effects of oxypeucedanin on hKv1.5 and action potential duration. *Biol Pharm Bull* 2005;28(4):657-60.
- (264) Ahn HS, Choi JS, Choi BH, Kim MJ, Rhie DJ, Yoon SH *et al.* Inhibition of the cloned delayed rectifier K⁺ channels, Kv1.5 and Kv3.1, by riluzole. *Neuroscience* 2005;133(4):1007-19.
- (265) Fuller RW, Clemens JA. Pergolide: a dopamine agonist at both D1 and D2 receptors. *Life Sci* 1991;49(13):925-30.
- (266) Hong Z, Smith AJ, Archer SL, Wu XC, Nelson DP, Peterson D *et al.* Pergolide is an inhibitor of voltage-gated potassium channels, including Kv1.5, and causes pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 2005;112(10):1494-9.
- (267) Fukuda J, Kameyama M, Yamaguchi K. Breakdown of cytoskeletal filaments selectively reduces Na and Ca spikes in cultured mammal neurones. *Nature* 1981;294(5836):82-5.
- (268) Stossel TP. Contractile proteins in cell structure and function. *Annu Rev Med* 1978;29:427-57.
- (269) Choi BH, Park JA, Kim KR, Lee GI, Lee YT, Choe H *et al.* Direct block of cloned hKv1.5 channel by cytochalasins, actin-disrupting agents. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(2):C425-C436.
- (270) Delisle BP, Anson BD, Rajamani S, January CT. Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ Res* 2004;94(11):1418-28.
- (271) Corrado D, Basso C, Thiene G. Is it time to include ion channel diseases among cardiomyopathies? *J Electrocardiol* 2005;38(4 Suppl):81-7.
- (272) Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R *et al.* Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004;119(1):19-31.

- (273) Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A *et al.* A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;96(7):800-7.
- (274) Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M *et al.* Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004;109(1):30-5.
- (275) Schwartz PJ, Locati EH, Napolitano C, Priori SG. The long QT syndrome. In Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995; p. 791.
- (276) Napolitano C, Ronchetti E, Memmi M, Nastoli J, Faggiano G, Schwartz PJ *et al.* Molecular epidemiology of the long QT syndrome in a cohort of 267 probands. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(suppl A):87A.
- (277) Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL *et al.* Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes: *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*. *Circulation* 2000;102(10):1178-85.
- (278) Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2005;2(5):507-17.
- (279) Perez Riera AR, Ferreira C, Dubner SJ, Schapachnik E, Soares JD, Francis J. Brief review of the recently described short QT syndrome and other cardiac channelopathies. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2005;10(3):371-7.
- (280) Sagie A, Larson MG, Goldberg RJ, Bengtson JR, Levy D. An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1992;70(7):797-801.
- (281) Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. II. Syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation. (Presentation of 1st case in italian pediatric literature)]. *Clin Pediatr (Bologna)* 1963;45:656-83.
- (282) Ward OC. A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* 1964;54:103-6.
- (283) Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957;54(1):59-68.
- (284) Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ *et al.* Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996;12(1):17-23.

- (285) Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Atkinson DL, Keating MT. Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N Engl J Med* 1997;336(22):1562-7.
- (286) Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;80(5):795-803.
- (287) Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW *et al.* MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;97(2):175-87.
- (288) Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL *et al.* SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;80(5):805-11.
- (289) Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Strambadi M *et al.* A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000;343(4):262-7.
- (290) Ackerman MJ, Siu BL, Sturner WQ, Tester DJ, Valdivia CR, Makielski JC *et al.* Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 2001;286(18):2264-9.
- (291) Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, Fressart V, Simon F, Bozio A *et al.* Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(5):826-30.
- (292) Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB *et al.* Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet* 1995;57(5):1114-22.
- (293) Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH *et al.* Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003;421(6923):634-9.
- (294) Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J *et al.* A novel mutation in the potassium channel gene *KVLQT1* causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 1997;15(2):186-9.
- (295) Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y *et al.* KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997;17(3):267-8.
- (296) Priori SG, Napolitano C. Role of genetic analyses in cardiology: part I: mendelian diseases: cardiac channelopathies. *Circulation* 2006;113(8):1130-5.

- (297) Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A *et al.* Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002;110(3):381-8.
- (298) Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E *et al.* Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with β -blockers. *JAMA* 2004;292(11):1341-4.
- (299) Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C *et al.* Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001;103(1):89-95.
- (300) Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R *et al.* Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* 2003;108(8):965-70.
- (301) Bellocq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM *et al.* Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004;109(20):2394-7.
- (302) Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. Molecular basis of arrhythmias. *Circulation* 2005;112(16):2517-29.
- (303) Nademane K, Veerakul G, Nimmannit S, Chaowakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K *et al.* Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation* 1997;96(8):2595-600.
- (304) Brugada J, Brugada P. Further characterization of the syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation, and sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1997;8(3):325-31.
- (305) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;392(6673):293-6.
- (306) Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della BP, Giordano U *et al.* Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 2002;105(11):1342-7.
- (307) Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA *et al.* Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* 2002;105(6):707-13.
- (308) Antzelevitch C, Yan GX, Shimizu W. Transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenicity: the Brugada syndrome versus the long QT syndrome. *J Electrocardiol* 1999;32 Suppl:158-65.

- (309) Akai J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A *et al.* A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett* 2000;479(1-2):29-34.
- (310) Marcus FI. Depolarization/repolarization, electrocardiographic abnormalities, and arrhythmias in cardiac channelopathies. *J Electrocardiol* 2005;38(4 Suppl):60-3.
- (311) Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B *et al.* Mutations of the cardiac ryanodine receptor (*RyR2*) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;103(4):485-90.
- (312) Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R *et al.* Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (*hRyR2*) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;103(2):196-200.
- (313) Laitinen PJ, Swan H, Piippo K, Viitasalo M, Toivonen L, Kontula K. Genes, exercise and sudden death: molecular basis of familial catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Ann Med* 2004;36 Suppl 1:81-6.
- (314) Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da CA, Sebillon P *et al.* Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002;91(8):e21-e26.
- (315) Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M *et al.* Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;23(1):20-1.
- (316) Benson DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ *et al.* Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (*SCN5A*). *J Clin Invest* 2003;112(7):1019-28.
- (317) Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O *et al.* Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 2003;111(10):1537-45.
- (318) Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 1979;280(5719):235-6.
- (319) Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY *et al.* KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003;299(5604):251-4.
- (320) Hong K, Piper DR, az-Valdecantos A, Brugada J, Oliva A, Burashnikov E *et al.* De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res* 2005;68(3):433-40.

- (321) Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y *et al.* A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332(4):1012-9.
- (322) Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y *et al.* Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;75(5):899-905.
- (323) Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J* 2000;19(23):6326-30.
- (324) Ruffy R. Atrial fibrillation. In Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995; p. 682-90.
- (325) Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;415(6868):219-26.
- (326) Khairy P, Nattel S. New insights into the mechanisms and management of atrial fibrillation. *CMAJ* 2002;167(9):1012-20.
- (327) Van den Berg MP, Van G, I, Van Veldhuisen DJ. Impact of atrial fibrillation on mortality in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002;4(5):571-5.
- (328) Halperin JL, Hart RG. Atrial fibrillation and stroke: new ideas, persisting dilemmas. *Stroke* 1988;19(8):937-41.
- (329) Roy D, Talajic M, Dubuc M, Thibault B, Guerra PG, Macle L *et al.* Atrial fibrillation: basic and clinical research at the Montreal Heart Institute. *Can J Cardiol* 2005;21(12):1091-6.
- (330) Mines GR. On dynamic equilibrium in the heart. *J Physiol* 1913;46:349-83.
- (331) Mines GR. On circulating excitations in heart muscles and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Proc Trans R Soc Can* 1914;8:43-53.
- (332) Wiener N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex* 1946;16:205-65.
- (333) Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res* 1977;41(1):9-18.

- (334) Rensma PL, Alessie MA, Lammers WJ, Bonke FI, SchaliJ MJ. Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res* 1988;62(2):395-410.
- (335) Panfilov AV, Pertsov AM. Mechanism of the origin of the helical waves in active media associated with the phenomenon of critical curvature. *Biofizika* 1982;27:886-9.
- (336) Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 2005;48(1):9-28.
- (337) Skanes AC, Mandapati R, Berenfeld O, Davidenko JM, Jalife J. Spatiotemporal periodicity during atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 1998;98(12):1236-48.
- (338) Ikeda T, Uchida T, Hough D, Lee JJ, Fishbein MC, Mandel WJ *et al*. Mechanism of spontaneous termination of functional reentry in isolated canine right atrium. Evidence for the presence of an excitable but nonexcited core. *Circulation* 1996;94(8):1962-73.
- (339) Kneller J, Zou R, Vigmond EJ, Wang Z, Leon LJ, Nattel S. Cholinergic atrial fibrillation in a computer model of a two-dimensional sheet of canine atrial cells with realistic ionic properties. *Circ Res* 2002;90(9):E73-E87.
- (340) Vigmond EJ, Tsoi V, Kuo S, Arevalo H, Kneller J, Nattel S *et al*. The effect of vagally induced dispersion of action potential duration on atrial arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2004;1(3):334-44.
- (341) Okishige K, Nishizaki M, Azegami K, Igawa M, Yamawaki N, Aonuma K. Pilsicainide for conversion and maintenance of sinus rhythm in chronic atrial fibrillation: A placebo-controlled, multicenter study. *Am Heart J* 2000;140(3):437-44.
- (342) Wijffels MC, Dorland R, Mast F, Alessie MA. Widening of the excitable gap during pharmacological cardioversion of atrial fibrillation in the goat: effects of cibenzoline, hydroquinidine, flecainide, and d-sotalol. *Circulation* 2000;102(2):260-7.
- (343) Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G *et al*. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;339(10):659-66.
- (344) Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D *et al*. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation* 2002;105(20):2442-8.

- (345) Hamabe A, Okuyama Y, Miyauchi Y, Zhou S, Pak HN, Karagueuzian HS *et al.* Correlation between anatomy and electrical activation in canine pulmonary veins. *Circulation* 2003;107(11):1550-5.
- (346) Ehrlich JR, Cha TJ, Zhang L, Chartier D, Melnyk P, Hohnloser SH *et al.* Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties. *J Physiol* 2003;551(Pt 3):801-13.
- (347) Oral H, Chugh A, Good E, *et al.* Randomized comparison of left atrial ablation to encircle the pulmonary veins vs left atrial linear ablation guided by local electrograms for chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2004;110:III-542.
- (348) Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92(7):1954-68.
- (349) Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995;91(5):1588-95.
- (350) Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation* 1996;94(11):2953-60.
- (351) Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 1997;96(11):4027-35.
- (352) Ausma J, Dispensyn GD, Duimel H, Thone F, Ver DL, Allessie MA *et al.* Changes in ultrastructural calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32(3):355-64.
- (353) Ramirez RJ, Nattel S, Courtemanche M. Mathematical analysis of canine atrial action potentials: rate, regional factors, and electrical remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(4):H1767-H1785.
- (354) Skasa M, Jungling E, Picht E, Schondube F, Luckhoff A. L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2001;96(2):151-9.
- (355) Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS *et al.* Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(5):1231-7.

- (356) Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001;52(2):226-35.
- (357) Grammer JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;11(6):626-33.
- (358) Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;81(4):512-25.
- (359) Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Nattel S. Atrial fibrillation: basic mechanisms, remodeling and triggers. *J Interv Card Electrophysiol* 2005;13(3):181-93.
- (360) Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;44(1):121-31.
- (361) Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K^+ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;80(6):772-81.
- (362) Brandt MC, Priebe L, Bohle T, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. The ultrarapid and the transient outward K^+ current in human atrial fibrillation. Their possible role in postoperative atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32(10):1885-96.
- (363) Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS *et al.* Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation. *Cardiology* 1999;92(4):248-55.
- (364) Brundel BJ, Van G, I, Henning RH, Tuinenburg AE, Wietses M, Grandjean JG *et al.* Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K^+ channels. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(3):926-32.
- (365) Balana B, Dobrev D, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. Decreased ATP-sensitive K^+ current density during chronic human atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35(12):1399-405.
- (366) Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C *et al.* Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K^+ current $I_{K,ACH}$ in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced $I_{K,ACH}$ and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;104(21):2551-7.

- (367) Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;84(7):776-84.
- (368) van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, van ZM, Groenewegen WA, Allessie MA *et al.* Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9(6):596-607.
- (369) Polontchouk L, Haefliger JA, Ebel B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U *et al.* Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(3):883-91.
- (370) Wetzel U, Boldt A, Lauschke J, Weigl J, Schirdewahn P, Dorszewski A *et al.* Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies. *Heart* 2005;91(2):166-70.
- (371) Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002;54(2):361-79.
- (372) Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Inoue N, Matsumoto T, Yamada J *et al.* Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. *Am J Cardiol* 2003;91(6):678-83.
- (373) Sakabe M, Fujiki A, Nishida K, Sugao M, Nagasawa H, Tsuneda T *et al.* Enalapril prevents perpetuation of atrial fibrillation by suppressing atrial fibrosis and over-expression of connexin43 in a canine model of atrial pacing-induced left ventricular dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(6):851-9.
- (374) Klein HU, Goette A. Blockade of atrial angiotensin II type 1 receptors: a novel antiarrhythmic strategy to prevent atrial fibrillation? *J Am Coll Cardiol* 2003;41(12):2205-6.
- (375) Kim DK, Huh JE, Lee SH, Hong KP, Park JE, Seo JD *et al.* Angiotensin II stimulates proliferation of adventitial fibroblasts cultured from rat aortic explants. *J Korean Med Sci* 1999;14(5):487-96.
- (376) Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE *et al.* Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation* 2000;101(10):1130-7.
- (377) Nakashima H, Kumagai K, Urata H, Gondo N, Ideishi M, Arakawa K. Angiotensin II antagonist prevents electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* 2000;101(22):2612-7.
- (378) Kumagai K, Nakashima H, Urata H, Gondo N, Arakawa K, Saku K. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(12):2197-204.

- (379) Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, Oertel LB, Harrigan P, Hughes RA *et al.* Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation* 1990;82(3):792-7.
- (380) Van G, I, Crijns HJ, Van Gilst WH, Hamer HP, Lie KI. Decrease of right and left atrial sizes after direct-current electrical cardioversion in chronic atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 1991;67(1):93-5.
- (381) Gosselink AT, Crijns HJ, Hamer HP, Hillege H, Lie KI. Changes in left and right atrial size after cardioversion of atrial fibrillation: role of mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(6):1666-72.
- (382) Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997;96(9):3157-63.
- (383) Borgers M, Ausma J. Structural aspects of the chronic hibernating myocardium in man. *Basic Res Cardiol* 1995;90(1):44-6.
- (384) Brundel BJ, Ausma J, van Gelder IC, Van der Want JJ, Van Gilst WH, Crijns HJ *et al.* Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;54(2):380-9.
- (385) Brundel BJ, Kampinga HH, Henning RH. Calpain inhibition prevents pacing-induced cellular remodeling in a HL-1 myocyte model for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2004;62(3):521-8.
- (386) Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D *et al.* Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11860-5.
- (387) Communal C, Sumandea M, de TP, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(9):6252-6.
- (388) Goette A, Arndt M, Rocken C, Staack T, Bechtloff R, Reinhold D *et al.* Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(1):H264-H272.
- (389) Black IW, Fatkin D, Sagar KB, Khandheria BK, Leung DY, Galloway JM *et al.* Exclusion of atrial thrombus by transesophageal echocardiography does not preclude embolism after cardioversion of atrial fibrillation. A multicenter study. *Circulation* 1994;89(6):2509-13.
- (390) Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991;22(8):983-8.

- (391) Agmon Y, Khandheria BK, Gentile F, Seward JB. Echocardiographic assessment of the left atrial appendage. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(7):1867-77.
- (392) Katz AM. Physiology of the heart, 4th edition. 2006. Philadelphia, PA 19106 USA, Lippincott Williams & Wilkins. Ref Type: Generic.
- (393) Lip GY. Does atrial fibrillation confer a hypercoagulable state? *Lancet* 1995;346(8986):1313-4.
- (394) Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation* 2003;107(25):3141-5.
- (395) Lip GY, Lowe GD. Fibrin D-dimer: a useful clinical marker of thrombogenesis? *Clin Sci (Lond)* 1995;89(3):205-14.
- (396) Blann AD, Lip GY, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost* 1997;77(6):1077-80.
- (397) Chung MK, Martin DO, Sprecher D, Wazni O, Kanderian A, Carnes CA *et al*. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;104(24):2886-91.
- (398) Aviles RJ, Martin DO, pperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA *et al*. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation* 2003;108(24):3006-10.
- (399) Conway DS, Buggins P, Hughes E, Lip GY. Relationship of interleukin-6 and C-reactive protein to the prothrombotic state in chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(11):2075-82.
- (400) Valderrama AL, Dunbar SB, Mensah GA. Atrial fibrillation: public health implications. *Am J Prev Med* 2005;29(5 Suppl 1):75-80.
- (401) Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ *et al*. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103(5):769-77.
- (402) Ehrlich JR, Nattel S, Hohnloser SH. Atrial fibrillation and congestive heart failure: specific considerations at the intersection of two common and important cardiac disease sets. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13(4):399-405.
- (403) Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 1991;325(5):293-302.

- (404) Doval HC, Nul DR, Grancelli HO, Perrone SV, Bortman GR, Curiel R. Randomised trial of low-dose amiodarone in severe congestive heart failure. Grupo de Estudio de la Sobrevida en la Insuficiencia Cardiaca en Argentina (GESICA). *Lancet* 1994;344(8921):493-8.
- (405) Berthe C, Boutefeu J-M, Boxho G, *et al.* Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353(9169):2001-7.
- (406) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med* 1987;316(23):1429-35.
- (407) Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med* 1982;306(17):1018-22.
- (408) Lehmann M, Keul J, Dickhuth HH. [Plasma catecholamines and hemodynamics in patients with heart failure (author's transl)]. *Herz* 1982;7(3):188-97.
- (409) Cohn JN, Levine TB, Francis GS, Goldsmith S. Neurohumoral control mechanisms in congestive heart failure. *Am Heart J* 1981;102(3 Pt 2):509-14.
- (410) Schoonderwoerd BA, Van G, I, Van Veldhuisen DJ, Van den Berg MP, Crijns HJ. Electrical and structural remodeling: role in the genesis and maintenance of atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* 2005;48(3):153-68.
- (411) Kamkin A, Kiseleva I, Wagner KD, Bohm J, Theres H, Gunther J *et al.* Characterization of stretch-activated ion currents in isolated atrial myocytes from human hearts. *Pflugers Arch* 2003;446(3):339-46.
- (412) Zhang Y, Gao F, Popov VL, Wen JW, Hamill OP. Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 2000;523 Pt 1:117-30.
- (413) Wong CK, White HD, Wilcox RG, Criger DA, Califf RM, Topol EJ *et al.* Significance of atrial fibrillation during acute myocardial infarction, and its current management: insights from the GUSTO-3 trial. *Card Electrophysiol Rev* 2003;7(3):201-7.
- (414) Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2003;107(14):1930-6.
- (415) Verheule S, Wilson E, Everett T, Shanbhag S, Golden C, Olgin J. Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation. *Circulation* 2003;107(20):2615-22.

- (416) Miller JT, O'Rourke RA, Crawford MH. Left atrial enlargement: an early sign of hypertensive heart disease. *Am Heart J* 1988;116(4):1048-51.
- (417) Solti F, Vecsey T, Kekesi V, Juhasz-Nagy A. The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1989;23(10):882-6.
- (418) Ravelli F, Allessie M. Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation* 1997;96(5):1686-95.
- (419) Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339(5):321-8.
- (420) Roy D, Paillard F, Cassidy D, Bourassa MG, Gutkowska J, Genest J *et al*. Atrial natriuretic factor during atrial fibrillation and supraventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 1987;9(3):509-14.
- (421) Fuller JA, Adams GG, Buxton B. Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. Is it a disorder of the elderly? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;97(6):821-5.
- (422) Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998;98(10):946-52.
- (423) Levy S. Epidemiology and classification of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9(8 Suppl):S78-S82.
- (424) Kolvekar S, D'Souza A, Akhtar P, Reek C, Garratt C, Spyt T. Role of atrial ischaemia in development of atrial fibrillation following coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11(1):70-5.
- (425) Wazni OM, Martin DO, Marrouche NF, Latif AA, Ziada K, Shaaraoui M *et al*. Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation* 2004;110(2):124-7.
- (426) Dupont E, Ko Y, Rothery S, Coppens SR, Baghai M, Haw M *et al*. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103(6):842-9.
- (427) Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;85(5):428-36.

- (428) Wahr JA, Parks R, Boisvert D, Comunale M, Fabian J, Ramsay J *et al.* Preoperative serum potassium levels and perioperative outcomes in cardiac surgery patients. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *JAMA* 1999;281(23):2203-10.
- (429) Mandal K, Jahangiri M, Mukhin M, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 2004;110(17):2588-90.
- (430) Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation* 2002;106(21):2727-33.
- (431) Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998;83(2):117-32.
- (432) Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, Di CA, Nasso G, Burzotta F *et al.* The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II195-II199.
- (433) Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR *et al.* Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001;104(2):174-80.
- (434) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):C1424-C1437.
- (435) Mihm MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA. Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 2001;49(4):798-807.
- (436) Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J* 2000;14(2):271-8.
- (437) Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S *et al.* Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res* 2001;89(6):E32-E38.
- (438) Kirsch M, de GH. Ascorbate is a potent antioxidant against peroxynitrite-induced oxidation reactions. Evidence that ascorbate acts by re-reducing substrate radicals produced by peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000;275(22):16702-8.
- (439) Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, Nattel S. Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs. *Circulation* 2004;110(16):2313-9.

- (440) Jideus L, Ericson M, Stridsberg M, Nilsson L, Blomstrom P, Blomstrom-Lundqvist C. Diminished circadian variation in heart rate variability before surgery in patients developing postoperative atrial fibrillation. *Scand Cardiovasc J* 2001;35(4):238-44.
- (441) Andrews TC, Reimold SC, Berlin JA, Antman EM. Prevention of supraventricular arrhythmias after coronary artery bypass surgery. A meta-analysis of randomized control trials. *Circulation* 1991;84(5 Suppl):III236-III244.
- (442) Olshansky B. Management of atrial fibrillation after coronary artery bypass graft. *Am J Cardiol* 1996;78(8A):27-34.
- (443) Kyosola K, Mattila T, Harjula A, Kyosola H, Waris T. Life-threatening complications of cardiac operations and occurrence of myocardial catecholamine bombs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;95(2):334-9.
- (444) Olshansky B. Interrelationships between the autonomic nervous system and atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* 2005;48(1):57-78.
- (445) Euler DE, Olshansky B, Kim SY. Reflex vagal control of atrial repolarization. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 2):H870-H875.
- (446) Spach MS, Heidlage JF, Dolber PC, Barr RC. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circ Res* 2000;86(3):302-11.
- (447) Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, Sr., Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ *et al*. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA* 2004;291(23):2851-5.
- (448) Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnant JP, Holmes DR, Jr., Ilstrup DM *et al*. The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. *N Engl J Med* 1987;317(11):669-74.
- (449) Brand FN, Abbott RD, Kannel WB, Wolf PA. Characteristics and prognosis of lone atrial fibrillation. 30-year follow-up in the Framingham Study. *JAMA* 1985;254(24):3449-53.
- (450) Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, Jahangir A, Gersh BJ, Shen WK *et al*. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(12):2185-92.
- (451) Wolff L. Familiar auricular fibrillation. *N Engl J Med* 1943;229:396.

- (452) Oberti C, Wang L, Li L, Dong J, Rao S, Du W *et al.* Genome-wide linkage scan identifies a novel genetic locus on chromosome 5p13 for neonatal atrial fibrillation associated with sudden death and variable cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110(25):3753-9.
- (453) Ellinor PT, Shin JT, Moore RK, Yoerger DM, MacRae CA. Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. *Circulation* 2003;107(23):2880-3.
- (454) Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L *et al.* Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N Engl J Med* 1997;336(13):905-11.
- (455) Lai LP, Tsai CC, Su MJ, Lin JL, Chen YS, Tseng YZ *et al.* Atrial fibrillation is associated with accumulation of aging-related common type mitochondrial DNA deletion mutation in human atrial tissue. *Chest* 2003;123(2):539-44.
- (456) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65.
- (457) Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 1997;77(2):425-64.
- (458) Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res* 1992;275(3-6):169-80.
- (459) Lamarche J, O'hara G, Philippon F, Gilbert M, Daleau P. Molecular analysis of connexin 40 in the familial form of atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2001;22(16):1511-2.
- (460) Prystowsky EN. Management of atrial fibrillation: therapeutic options and clinical decisions. *Am J Cardiol* 2000;85(10A):3D-11D.
- (461) Cannom DS. Atrial fibrillation: nonpharmacologic approaches. *Am J Cardiol* 2000;85(10A):25D-35D.
- (462) Schoonderwoerd BA, van Gelder IC, Van Veldhuisen DJ, Tieleman RG, Grandjean JG, Bel KJ *et al.* Electrical remodeling and atrial dilation during atrial tachycardia are influenced by ventricular rate: role of developing tachycardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12(12):1404-10.
- (463) Schoonderwoerd BA, Ausma J, Crijns HJ, Van Veldhuisen DJ, Blaauw EH, van Gelder I. Atrial ultrastructural changes during experimental atrial tachycardia depend on high ventricular rate. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15(10):1167-74.

- (464) Raghavan AV, Decker WW, Meloy TD. Management of atrial fibrillation in the emergency department. *Emerg Med Clin North Am* 2005;23(4):1127-39.
- (465) Elam K, Bolar-Softich KL. Dilemmas in the acute pharmacologic treatment of uncontrolled atrial fibrillation. *Am J Emerg Med* 1997;15(4):418-9.
- (466) Van Noord T, Van Gelder IC, Tieleman RG, Bosker HA, Tuinenburg AE, Volkens C *et al.* VERDICT: the Verapamil versus Digoxin Cardioversion Trial: A randomized study on the role of calcium lowering for maintenance of sinus rhythm after cardioversion of persistent atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12(7):766-9.
- (467) Falk RH, Leavitt JI. Digoxin for atrial fibrillation: a drug whose time has gone? *Ann Intern Med* 1991;114(7):573-5.
- (468) Danias PG, Caulfield TA, Weigner MJ, Silverman DI, Manning WJ. Likelihood of spontaneous conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(3):588-92.
- (469) McNamara RL, Tamariz LJ, Segal JB, Bass EB. Management of atrial fibrillation: review of the evidence for the role of pharmacologic therapy, electrical cardioversion, and echocardiography. *Ann Intern Med* 2003;139(12):1018-33.
- (470) Gillinov AM, Wolf RK. Surgical ablation of atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* 2005;48(3):169-77.
- (471) Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126(3 Suppl):204S-33S.
- (472) Stoddard MF, Dawkins PR, Prince CR, Longaker RA. Transesophageal echocardiographic guidance of cardioversion in patients with atrial fibrillation. *Am Heart J* 1995;129(6):1204-15.
- (473) Roy D, Talajic M, Dorian P, Connolly S, Eisenberg MJ, Green M *et al.* Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med* 2000;342(13):913-20.
- (474) Campbell TJ. Subclassification of class I antiarrhythmic drugs: enhanced relevance after CAST. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992;6(5):519-28.
- (475) Greene HL, Roden DM, Katz RJ, Woosley RL, Salerno DM, Henthorn RW. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial: first CAST ... then CAST-II. *J Am Coll Cardiol* 1992;19(5):894-8.

- (476) Fynn SP, Todd DM, Hobbs WJ, Armstrong KL, Fitzpatrick AP, Garratt CJ. Clinical evaluation of a policy of early repeated internal cardioversion for recurrence of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13(2):135-41.
- (477) Bertaglia E, D'Este D, Zerbo F, Zoppo F, Delise P, Pascotto P. Success of serial external electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation in maintaining sinus rhythm; a randomized study. *Eur Heart J* 2002;23(19):1522-8.
- (478) Van Gelder IC, Hagens VE, Bosker HA, Kingma JH, Kamp O, Kingma T *et al.* A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002;347(23):1834-40.
- (479) Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB *et al.* A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002;347(23):1825-33.
- (480) Gillinov AM, McCarthy PM. Advances in the surgical treatment of atrial fibrillation. *Cardiol Clin* 2004;22(1):147-57.
- (481) McCarthy PM, Gillinov AM, Castle L, Chung M, Cosgrove D, III. The Cox-Maze procedure: the Cleveland Clinic experience. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2000;12(1):25-9.
- (482) Schaff HV, Dearani JA, Daly RC. Cox-Maze procedure for atrial fibrillation: Mayo Clinic experience. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2002;12:30-7.
- (483) Arcidi JM, Jr., Doty DB, Millar RC. The Maze procedure: the LDS Hospital experience. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2000;12(1):38-43.
- (484) Cox JL, Ad N, Palazzo T, Fitzpatrick S, Suyderhoud JP, DeGroot KW *et al.* Current status of the Maze procedure for the treatment of atrial fibrillation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2000;12(1):15-9.
- (485) Cox JL, Jaquiss RD, Schuessler RB, Boineau JP. Modification of the maze procedure for atrial flutter and atrial fibrillation. II. Surgical technique of the maze III procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110(2):485-95.
- (486) Oral H. Pulmonary vein occlusion/stenosis after pulmonary vein ablation for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14(4):371-2.
- (487) Gillinov AM, Pettersson G, Rice TW. Esophageal injury during radiofrequency ablation for atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122(6):1239-40.
- (488) Doll N, Borger MA, Fabricius A, Stephan S, Gummert J, Mohr FW *et al.* Esophageal perforation during left atrial radiofrequency ablation: Is the risk too high? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125(4):836-42.

- (489) Cappato R, Calkins H, Chen SA, Davies W, Iesaka Y, Kalman J *et al.* Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation. *Circulation* 2005;111(9):1100-5.
- (490) Firouzi M, Ramanna H, Kok B, Jongsma HJ, Koeleman BP, Doevendans PA *et al.* Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* 2004;95(4):e29-e33.
- (491) Juang JM, Chern YR, Tsai CT, Chiang FT, Lin JL, Hwang JJ *et al.* The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2006.
- (492) Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 1999;99(11):1508-15.
- (493) Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K, Jongsma HJ. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10(10):1380-9.
- (494) Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q *et al.* Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2006;354(25):2677-88.
- (495) Tsai CT, Lai LP, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, Ritchie MD *et al.* Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. *Circulation* 2004;109(13):1640-6.
- (496) Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C *et al.* Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(6):1669-77.
- (497) Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y, Hoh E *et al.* Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* 1990;265(7):3595-8.
- (498) Asselbergs FW, Moore JH, Van den Berg MP, Rimm EB, de Boer RA, Dullaart RP *et al.* A role for CETP TaqIB polymorphism in determining susceptibility to atrial fibrillation: a nested case control study. *BMC Med Genet* 2006;7:39.
- (499) Borggreve SE, Hillege HL, Wolffenbuttel BH, de Jong PE, Bakker SJ, van der SG *et al.* The effect of cholesteryl ester transfer protein -629C->A promoter polymorphism on high-density lipoprotein cholesterol is dependent on serum triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):4198-204.

- (500) Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764-72.
- (501) Boekholdt SM, Kuivenhoven JA, Wareham NJ, Peters RJ, Jukema JW, Luben R *et al*. Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)-Norfolk population study. *Circulation* 2004;110(11):1418-23.
- (502) Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, Shepherd J, Freeman DJ, McMahon AD *et al*. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation* 2005;111(3):278-87.
- (503) Dixit M, Bhattacharya S, Mittal B. Association of CETP TaqI and APOE polymorphisms with type II diabetes mellitus in North Indians: a case control study. *BMC Endocr Disord* 2005;5:7.
- (504) Fatini C, Sticchi E, Genuardi M, Sofi F, Gensini F, Gori AM *et al*. Analysis of minK and eNOS genes as candidate loci for predisposition to non-valvular atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2006;27(14):1712-8.
- (505) Lai LP, Su MJ, Yeh HM, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ *et al*. Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2002;144(3):485-90.
- (506) Ehrlich JR, Zicha S, Coutu P, Hebert TE, Nattel S. Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovasc Res* 2005;67(3):520-8.
- (507) Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H *et al*. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999;99(22):2864-70.
- (508) Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993;268(35):26286-95.
- (509) Drolet B, Simard C, Mizoue L, Roden DM. Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drug-binding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 2005;115(8):2209-13.

CHAPITRE 2

ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THREE NON-SYNONYMOUS SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

(R87Q, A251T AND P307S) FOUND IN hKV1.5

Electrophysiological Characterization of Three Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms (R87Q, A251T and P307S) Found in hKv1.5

Isabelle Plante^{1,2}, Dominique Fournier¹, Guylaine Ricard¹, Benoît Drolet^{1,2}, Gilles O'Hara¹, Jean Champagne¹, Patrick Mathieu¹, Richard Baillot¹, Pascal Daleau^{1,2}

¹Quebec Heart Institute, Laval Hospital Research Centre, Sainte-Foy, Quebec, Canada, G1V 4G5

²Faculty of Pharmacy, Laval University, Sainte-Foy, Quebec, Canada, G1K 7P4

Correspondence to:

Pascal Daleau, PhD

Laval Hospital Research Center

2725 chemin Ste-Foy, Quebec, PQ, Canada, G1V 4G5

tel. 418 656 8711 ext. 5394

fax. 418 656 4509

e-mail: pascal.daleau@pha.ulaval.ca

Publié dans *Pflugers Archivs* 2006;452:316-23.

RÉSUMÉ

Des polymorphismes non-synonymes ont récemment été identifiés dans le gène *KCNA5/hKv1.5*, qui code pour un canal potassique dépendant du voltage responsable du courant I_{Kur} exprimé dans l'oreillette humaine. Afin de mieux connaître l'influence potentielle des polymorphismes dans le gène *hKv1.5*, nous avons recherché leur présence chez une population spécifique de 96 Canadiens-Français et caractérisé leurs propriétés électrophysiologiques dans deux lignées cellulaires. La région présumée du promoteur (-83 pb) ainsi que la région codante ont été séquencées. Nous avons identifié trois polymorphismes à l'état hétérozygote : R87Q, A251T et P307S. Ces derniers ont été reproduits par mutagenèse dirigée. L'analyse fonctionnelle des variants du canal hKv1.5 transfectés dans des cellules CHO (Chinese hamster ovary) a démontré que R87Q et P307S diminuaient l'amplitude de l'inactivation (par exemple, à +60 mV, les amplitudes étaient respectivement de 89 ± 26 , 23 ± 4 et 22 ± 7 pA/pF pour le canal sauvage et les variants R87Q et P307S ; $n=8$, 6 et 8, respectivement). L'inactivation était ralentie pour ces variants (par exemple, les τ_{fast} à +50 mV étaient de 270 ± 48 , 490 ± 66 et 340 ± 45 msec pour le canal sauvage, R87Q et P307S respectivement) et R87Q accélérât aussi la vitesse d'ouverture du canal hKv1.5. Un effet plutôt dominant a été observé pour R87Q, mais pas pour P307S. Les propriétés électrophysiologiques de ces variants n'étaient pas reproduites lorsqu'ils étaient exprimés dans une lignée de cellules HEK293, ce qui suggère que la sous-unité β régulatrice présente dans les cellules CHO (et dans le cœur humain) est essentielle à l'expression des effets que nous avons observés.

MOTS-CLÉS: hKv1.5, polymorphismes, mutagenèse dirigée, cellules CHO, cellules HEK293, patch-clamp

ABSTRACT

Non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *KCNA5/hKv1.5* gene, which encodes for a voltage-gated K⁺ channel responsible for the I_{Kur} current in the human atria, have been recently reported. To gain further knowledge on potential influence of *hKv1.5* SNPs, we searched for their presence in a specific population of 96 French-Canadians and characterized electrophysiological properties of the variants in two cell lines. The presumed promoter (-83 bp) and coding regions were sequenced. We found three heterozygous SNPs: R87Q, A251T and P307S. Functional analysis of SNPs transfected in CHO cells showed that both R87Q and P307S diminished the inactivation amplitude (e.g., at +60mV, amplitudes were respectively 89±26, 23±4 and 22±7 pA/pF for the wild-type, R87Q and P307S; n=8, 6 and 8 respectively). Inactivation was slowed with these variants (e.g., τ_{fast} at +50mV were respectively 270±48, 490±66 and 340±45 ms for the wild-type, R87Q and P307S) while R87Q additionally accelerated the rate of hKv1.5 channel opening. A dominant-negative effect was observed for R87Q but not for P307S. SNPs properties were not reproduced when expressed in the HEK293 cell line suggesting that the regulatory β -subunit present in CHO cells (and the human heart) is essential for the SNPs effects that we have observed.

KEY WORDS

hKv1.5, single nucleotide polymorphisms, directed mutagenesis, CHO cells, HEK293 cells, patch-clamp

INTRODUCTION

hKv1.5, a voltage-gated K⁺ channel, was identified for the first time in native myocytes from human heart by Fedida *et al.* [10]. The current generated through hKv1.5 is similar to the ultra rapid delayed rectifier (I_{Kur}) identified in human atrial myocytes, a major repolarizing current of the atria [24]. This channel is widely expressed throughout the cardiovascular system and elsewhere. It is found in particular in human adult and fetal hearts [21,10], in vascular and intestinal smooth muscles [5,14] and in airways [1].

hKv1.5 shows a fast, voltage-dependent and sigmoid activation, while the inactivation is represented by a dual phenomenon: a slow, incomplete C-type inactivation [20] and a faster N-type inactivation that depends on the presence of an accessory β -subunit [18]. Three regulatory β -subunits (Kv β 1.2, Kv β 1.3 and Kv β 2.1) were shown to interact with the N-terminal domain of Kv1.5, altering the extent and rate of inactivation of the channel [18,22,25].

In two recent reports, the *KCNA5 / hKv1.5* gene was screened for polymorphisms in three ethnic groups of anonymized individuals [6,19]. Six nonsynonymous polymorphisms were found (A115V, A251T, P307S, P310L, P532L and R578K) but expression of these *hKv1.5* variants did not present any difference from the wild-type channel although two of them were resistant to block by quinidine. However, the time constants of activation were measured only for a +50 mV voltage pulse and effects on the inactivation were not reported.

Thus, to gain further knowledge on the potential influence of *hKv1.5* SNPs, we searched for their presence in a specific population of 96 French-Canadians. We found three heterozygous SNPs: R87Q, A251T and P307S. Electrophysiological characterization of the mutant channels were assessed in two cell lines (CHO and HEK293); two variants (i.e. R87Q and P307S) affected the expression level of the channel and changed the inactivation process but only in CHO cells, which suggests that an hKv1.5 accessory β -subunit is involved.

METHODS

Patients and DNA preparation

This study was carried out from blood samples of 96 French-Canadians obtained from the GenetICQ tissues bank of the Quebec Heart Institute. All patients have undergone a coronary artery bypass grafting and 46 (52%) developed new onset of post-operative episodes of AF significant enough to require a pharmacological treatment (i.e. episodes of >2h duration or recurrent episodes of AF). Exclusion criteria were: left ventricular ejection fraction <40%, age >65 year-old, chronic obstructive pulmonary disease, documented history of previous AF and peri-operative myocardial infarction. Studies were approved according to ethical guidelines of Laval Hospital. Genomic DNA of patients was extracted from blood using the QIAamp DNA Blood Midikit protocol, as recommended by the manufacturer (QIAGEN, Mississauga, Canada).

Amplification and sequencing of hKv1.5

Polymerase chain reaction (PCR) primers (Table I) were initially selected in promoter and coding regions of the gene *hKv1.5*, using the OLIGO primer analysis software (version 6.0; MBI, Cascade, USA) and oligos were synthesized by Medicorp Inc (Montreal, Canada). PCR amplifications were done on 50 ng of total DNA in a thermal cycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research, Toronto, Canada), with *Taq* (Promega, Madison, USA) and *Pfu Turbo* (Stratagene, Vancouver, Canada) DNA polymerases according to the manufacturer's protocol. Samples were denatured for 5 minutes at 94°C and then cycled by denaturing 1 minute at 94°C, annealing 1 minute at 55°C and extending 2 minutes at 72°C (35 cycles). A final 10 minute extension period was added.

PCR products were visualized and purified on an agarose gel stained with ethidium bromide and sequenced on both strands. Nucleotide sequence determinations were done at the Nucleic Acids Analysis and Synthesis Service, Laval University (Sainte-Foy, Canada) on an Applied Biosystem 3100 genetic analyzer (Perkin-Elmer, Mississauga, Canada) using

the fluorescent dideoxy terminator sequencing protocol as recommended by the manufacturer. Electrophoretograms were visualized using Chromas software (version 1.45; Griffith University, Southport, Australia). Sequence comparisons between the wild-type and the *hKv1.5* gene of affected subjects were performed using CLUSTAL W (EMBL-EBI, Cambridge, UK).

The mutations found in *hKv1.5* were reproduced by PCR amplification with *Pfu Turbo* DNA polymerase and two complementary oligonucleotides containing the desired mutation (Table 2), using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit protocol as recommended by the manufacturer (Stratagene, La Jolla, USA). The constructs were sequenced on both strands to assure the presence of the mutation studied and the absence of random mutation induced by PCR.

Transfection and cell culture

Chinese Hamster Ovary (CHO) cells were maintained in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco-BRL, Grand Island, USA) and HEK 293 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, USA). Using the calcium phosphate precipitation technique [2] *hKv1.5* wild-type or *hKv1.5* variants cDNAs in pcDNA3 expression vector were cotransfected with the surface marker protein CD8 (EBO-pcD-CD8) in a 1:1 ratio. For electrophysiological studies, cells were incubated with anti-CD8-coated beads for 20 min (Dynabeads M-450 CD8; Dynal, Oslo, Norway). After incubation, cells were washed twice with the bathing solution to eliminate unbound beads. No morphological changes due to the cotransfection were observed in the CHO and HEK293 cells. *hKv1.5* channel activation I-V relationship was not modified by the presence of the CD8 antigen (data not shown).

Whole-cell voltage-clamp recordings:

All recordings were performed at room temperature (20°C) from CHO and HEK293 cells as previously described [3]. Cells were depolarized for 1250 ms to various voltages

between -50 and $+70$ mV by 10 mV increments then cells were repolarised to -80 mV for 300 ms. Series resistance was compensated 70 - 80% to improve whole-cell voltage-clamp measurements. Cell capacitance and series resistance were similar in cells transfected with hKv1.5 WT and any of the variant channels (10.5 ± 3.5 vs 11.4 ± 1.6 pF and 12.7 ± 2.8 vs 14.2 ± 2.5 M Ω respectively for the whole cell capacitance and series resistance in control- and variant-transfected CHO cells; mean \pm SEM, $n = 9$ and 32 , respectively). Currents were filtered at 2 kHz using a 4-pole Bessel filter (-3 dB/octave) and sampled at 10 kHz.

Analysis and Statistical Methods:

For each recording, the time courses of activation and inactivation were fitted using pCLAMP software (ClampFit version 9, Axon Instruments). An iterative simplex method was used with sum of squares minimization to ensure the reliability of the fitting procedure. Best fits were obtained using a bi-exponential fitting for activation and inactivation: $Y = A_1(\exp^{-t/\tau_1}) + A_2(\exp^{-t/\tau_2}) + R$, τ_1 and τ_2 being respectively the rapid and slow time constants. Normalized I-V curves of activating currents were fitted with a Boltzmann equation: $Y = \{1 + \exp[(V-V_{1/2})/k]\}^{-1}$, k being the slope factor, V , the voltage and $V_{1/2}$, the mid-point activation voltage. A 2-way ANOVA test was used to evaluate the statistical significance ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

We identified three *hKv1.5* single nucleotide polymorphisms (Figure 1) in 7 patients: R87Q (in the N-terminal domain of the channel) in one with post-operative AF, A251T (in the first transmembrane segment) in 3 (one with AF and two without) and P307S (in the first extracellular loop) in 3 patients with post-operative AF. All individuals were heterozygous for the mutations and none carried compound SNPs.

We did a multiple alignment of 16 *Kv1.5* genes of different species (sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information DNA Web Database,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ; alignment was performed using the CLUSTAL W 1.82 software, European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) : 5 from human, 2 from dog, 1 from ferret, 3 from rabbit, 4 from mouse and 1 from rat. We found that the 3 SNPs correspond to highly conserved residues in human. The R87 residue is conserved in all the 5 human genes reported but is replaced by a leucine in the dog and a glutamine in all other species. The A251 residue is fully present in all species except for the ferret, where it is replaced by a glycine. In position 307, a proline is found in four and an alanine in one of the five human *Kv1.5* gene sequences while a serine is present in *Kv1.5* genes of mouse and rat.

Respective allelic frequencies found in our French-Canadian population are presented in Table 3 and compared to those found by Simard *et al.* [19] in a Caucasian population of 95 patients.

Functional analysis of hKv1.5 variants

We characterized the currents elicited after functional expression of R87Q, A251T and P307S transiently transfected in CHO cells and compared them to the electrophysiological properties of the wild-type hKv1.5. Figure 2 upper left panel illustrates current waveforms obtained from expression of the wild-type *hKv1.5* gene. Transfected cells were stimulated from a holding potential of -80 mV to various voltages between -50 to +60 mV in 10 mV increments; tail currents were obtained following repolarization to -80 mV. The current activated rapidly from about -10 mV and inactivated slowly when voltages were $\geq +10$ mV. Currents elicited in A251T transfected cells were similar to the wild-type currents, but it is clear from recordings obtained in cells expressing the two other variants (Figure 2, right panels) that the inactivation process was slowed. Furthermore, by looking carefully at the first 100 ms of the activating currents, an increase in the rate of channel opening can be seen in currents elicited in the R87Q transfected cells at all the voltages tested.

Amplitudes of the peak activating currents (measured either at the peak amplitude when an inactivation was present, or at the end of the activation pulse when the current did not inactivate, i.e. for the lower voltage steps) from R87Q and P307S were significantly reduced compared to the wild-type for voltages $\geq +20$ mV (Figure 3). An additional series of experiments were performed in which the wild-type hKv1.5 and the variant cDNAs were co-transfected in equal amount (5 μ g). The WT/R87Q co-transfection presented a consistent reduction in activating current density as observed for R87Q expressed alone (Figure 3, upper panel). For example, at +40 mV voltage step, normalized current amplitude was reduced to 64% ($p < 0.05$) of the wild-type amplitude. In contrast, when P307S was co-expressed with the wild-type, the currents elicited tended to be similar to those obtained from the wild-type alone. The current-voltage relationships normalized to their respective maximum amplitude are presented in Figure 4. Half activation voltages obtained from normalized IV curves of activating currents were respectively 31.9 ± 2.4 mV, 39.9 ± 3.0 mV ($p < 0.05$ vs WT), 28.5 ± 1.4 mV and 38.6 ± 1.3 mV for the WT, R87Q, A251T and P307S.

Normalized inactivation amplitudes (pA/pF), measured as the difference between peak current amplitude and amplitude at the end of the depolarizing pulse, were similar in the wild-type hKv1.5 and A251T (data not shown) but larger compared to R87Q and P307S: amplitudes were significantly reduced for R87Q and P307S at voltages $\geq +10$ mV. For example, normalized inactivation amplitude was 25 ± 8 , 48 ± 16 and 89 ± 26 pA/pF at respectively +20, +40 and +60 mV for the wild-type hKv1.5 ($n = 8$) compared to 3 ± 1 , 8 ± 2 and 23 ± 4 pA/pF ($n = 6$; all p values < 0.005) for R87Q. As well, for the P307S, mean normalized inactivation was reduced to 2 ± 1 , 8 ± 3 and 22 ± 7 pA/pF respectively at the same voltages ($n = 8$; all p values < 0.005). Inactivation amplitudes were similar between the wild-type and WT/P307S but significantly reduced for WT/R87Q (a reduction to 44% at +40 mV; $p < 0.05$).

Activation kinetics were assessed using a bi-exponential fitting of the first 200 ms of the activation time course for voltage steps $\leq +10$ mV and of the first 30 ms for higher voltages (Figure 5). The rapid time constant of activation was significantly reduced for currents elicited by voltages $\geq +20$ mV in R87Q transfected cells compared to the wild-

type. τ_{fast} values determined from currents obtained for +20, +30, +40 and +50 mV voltage steps were respectively 4.21 ± 0.65 , 2.91 ± 0.37 , 2.08 ± 0.26 and 1.70 ± 0.24 ms in wild-type transfected cells compared to 3.50 ± 0.20 , 2.27 ± 0.13 , 1.70 ± 0.18 and 1.25 ± 0.19 ms (all p values < 0.05) in cells transfected with R87Q. Activation kinetics of wild-type and R87Q are illustrated in the lower part of Figure 5 by examples of normalized current traces elicited by stimulations to +20 and +50 mV.

We also examined inactivation kinetics of the wild-type hKv1.5 and variants (Figure 6). Bi-exponential fitting of the inactivation demonstrated that the inactivation process was slower in R87Q and P307S transfected cells compared to the wild-type hKv1.5. The rapid time constant of inactivation was increased significantly at voltages $\geq +40$ mV for the two variants. Inactivation τ_{fast} was respectively 421 ± 67 , 270 ± 48 and 212 ± 19 ms at +40, +50 and +60 mV for the wild-type (n = 8) compared to 605 ± 105 , 490 ± 66 and 333 ± 24 ms for R87Q (all p values < 0.05; n = 6) and to 474 ± 50 , 340 ± 45 and 292 ± 20 ms for P307S (all p values < 0.05; n = 8). The rapid inactivation time constant was also significantly different for WT/R87Q and WT/P307S compared to the wild-type (Figure 6). The slow time constants of inactivation were not significantly different between each variant and the wild-type. For example, at +60 mV τ_{slow} were respectively 2.19 ± 0.27 s, 1.56 ± 0.48 s, 2.00 ± 0.40 s and 1.20 ± 0.48 s for WT, R87Q, A251T and P307S.

Experiments were performed using an ‘action potential clamp’ (AP-clamp) protocol (Figure 7). Currents obtained from the wild-type and the different variants confirmed our findings on the effects observed on activation and inactivation kinetics. Currents elicited by an AP-clamp in R87Q-transfected cells show a more rapid activation and a slowed inactivation compared to the wild type. As well, the inactivation was slower in the presence of the P307S mutant which indicates that both mutations potentially increase the total current passing through Kv1.5/ I_{Kur} channels during an action potential. Effects of an AP-clamp saline at a frequency of 2Hz were also tested but no changes in current amplitudes were observed for all currents which is consistent with the rapid recovery from inactivation of hKv1.5 [23].

It has been shown that the HEK293 cell line, in which hKv1.5 presents a modest degree of inactivation, does not express endogenous β -subunits in contrast to L-cells and

CHO cells [22]. Thus, we assessed properties of wild type hKv1.5 and of the different variants when expressed in HEK293 cells. Not surprisingly, WT channels showed very little inactivation, and so did the three variants. WT and variant channels biophysics were not different in HEK293 cells. Mean current densities were not significantly different as well (data not shown).

DISCUSSION

We identified three *hKv1.5* single nucleotide polymorphisms, R87Q, A251T and P307S in 7 individuals derived from a population of 96 French-Canadians. Functional analysis of the *hKv1.5* variants obtained by directed mutagenesis and expression in the CHO mammalian cell line demonstrated that both R87Q and P307S reduced the slow inactivation process that develops during depolarization and that R87Q significantly accelerated the opening of hKv1.5 channel. The electrophysiological properties of the third *hKv1.5* variant, A251T, were essentially similar to those of the wild-type protein. Co-expression experiments (50/50) demonstrated that R87Q has a functional dominant-negative effect with a pronounced reduction in current density in contrast to P307S. The abnormal properties of the SNPs were not reproduced when expressed in the HEK293 cell line which suggests that the regulatory β -subunit present in CHO cells (but absent in HEK293 cells) [22] is essential to observe the SNP-induced changes in the channel properties. An association of hKv1.5 channel to a β -subunit has been demonstrated in the human heart [11] which suggests that these findings should be relevant to the human myocardium.

The inactivation process occurring during depolarizing voltage pulses was slowed and the amplitude decreased for R87Q and P307S compared to the wild-type protein (Figures 2 and 6). Inactivation kinetics estimated by a bi-exponential fitting showed that the rapid time constant of inactivation was significantly increased at voltages $\geq +40$ mV (Figure 6). Cloned β -subunits have been shown to modulate inactivation kinetics of hKv1.5. An increase in slow inactivation amplitude and kinetics was reported for all accessory proteins studied (i.e. Kv β 1.2 -originally designated Kv β 3-, Kv β 1.3 and Kv β 2.1)

[8,9,22]. Thus, as the presence of an endogenous Kv β 2.1 isoform was demonstrated in CHO cells [22], it is possible that R87Q and P307S, which were found to decrease the degree of slow inactivation of the current, could interfere with the hKv1.5 α - β subunits interaction. The absence of any modification of hKv1.5 electrophysiological properties that we observed when the 3 mutants were expressed in the HEK293 cell line argues in favour of this hypothesis. Kv β 1.3-induced fast inactivation of hKv1.5 involves an open channel block produced by its N-terminus (i.e. the inactivation 'ball') [22]. Considering the positions of the two mutations that altered hKv1.5 inactivation rate in our study (i.e. N-terminal segment and first extracellular loop), hKv1.5 segments other than the pore should be involved in the inactivation process, probably through a modification of the interaction between the α and β subunits. Although I_{Kur} /hKv1.5 inactivation develops slowly, the degree of inactivation at the onset of an action potential will depend on the relative time cells spend at depolarized voltages. During atrial fibrillation, atrial myocytes may very frequently experience high voltages and substantial inactivation can be expected; thus differences in inactivation rate may have direct consequences on atrial repolarization [11].

Opening kinetics of the R87Q channel was more rapid compared to the wild-type. This property can be appreciated from Figure 5 by looking at the initial 30 ms of the activating current. Activation kinetics, estimated from a bi-exponential fitting, show a significant reduction in the rapid time constant for voltages $\geq +20$ mV. This effect was unexpected as the segments of hKv1.5 that are likely to be implicated in channel activation are the S4 and S5-pore-S6 regions [16]. The change in activation delay suggests that the mutation could interfere with the multiple closed states before the channel enters into its activated state [15].

Current densities were significantly reduced for R87Q and P307S. Co-expression experiments (equal amount of WT and variant) demonstrated that R87Q has a functional dominant-negative effect with a pronounced reduction in current density in contrast to P307S. It has been shown that the trafficking to cell surface can be modulated by the presence of Kv β subunits [12,26]. As the current density was not significantly different in the HEK293 cells, our results suggest that SNPs could modulate Kv1.5 expression in CHO cells by interfering with a β -subunit. Alternatively, N-terminal sequences are important for

ER-targeting and surface expression regulation [17]. Interestingly, R87Q is within a region (i.e. aa65-93) which was shown to control Kv1.5 expression level [4]. Kv1.5 N-terminus also has a functional interaction with the PDZ domain containing SAP97 protein, an expression regulator for Kv1.5 [7]. Moreover, the interacting protein KCHIP2 that binds to the N-termini of Kv channels and modulates their surface density, was recently shown to contribute to the formation of functional Kv1.5 [13].

In conclusion, we identified three non-synonymous single nucleotide polymorphisms (i.e. R87Q, A251T, P307S) in the coding region of the *hKv1.5* gene. Both R87Q and P307S diminished and slowed the inactivation process while R87Q additionally accelerated the rate of hKv1.5 channel opening. A functional dominant-negative effect was clearly observed for R87Q but not for P307S. SNPs properties were not reproduced when expressed in the HEK 293 cell line suggesting that the regulatory β -subunit present in CHO cells is essential to observe SNPs-induced changes in the channel properties. An association of hKv1.5 channel to a β -subunit has been demonstrated in the human heart which suggests that these findings should be relevant to the human myocardium.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR-MOP 64383), the Quebec Heart Institute and the Heart and Stroke Foundation of Canada (Dr Daleau). Dr Drolet is a scholar from the Heart and Stroke Foundation of Canada and Ms Plante is the recipient of a CIHR-Rx&D PhD studentship. Dr. Ricard was the recipient of a Merck Frosst Foundation summer studentship. We thank Dr. Chantal Guillemette for providing advice for PCR and mutagenesis and Dr. Laimonis Gailis for reviewing the manuscript.

TABLES

Table 1. List of the primers used for PCR amplifications and sequencing.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	T _m (°C)*
Kv1.5-7F	GGAGGCGGCCAGAATGGGCAGC	76
Kv1.5-8R	CTGCCGGCTCCTCGTGATCCG	72
Kv1.5-9F	GTCCTCACCATTGCCCTGCCTG	72
Kv1.5-10R	CTCCCATTCCTACTCCACTGC	70
Kv1.5-12F	TTTGATCGCGCCAGCAAC	56
Kv1.5-13R	CCGGAGATGTTGATGTGGAC	62
Kv1.5-14F	AGGAGGAAGAAGGCGATCC	60
Kv1.5-17R	AAGATGGCCACCACATCGAT	60
Kv1.5-18F	AGCTGCTCGTGCGCTTCTT	60
Kv1.5-19R	GCTCCTCGTGATCCGTTTC	60

$$*T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

Tables 2. Sequences of the primers used for site-directed mutagenesis. The mutation sites are underlined.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Mutation	T _m (°C)*
R87Q-F	GAGGAGCTGCCAC <u>A</u> GCCTCGACGGCCG	CGG→CAG	94
R87Q-R	CGGCCGTCGAGGCT <u>T</u> GTGGCAGCTCCTC	CCG→CTG	94
A251T-F	GGGTCCGCGCGG <u>A</u> CCATCGCCATCG	GCC→ACC	88
A251T-R	CGATGGCGATGGT <u>T</u> CCGCGCGGACCC	GGC→GGT	88
P307S-F	GGTCATGGCCCCG <u>T</u> CCTCTGGCCCTAC	CCC →TCC	92
P307S-R	GTAGGGCCAGAGG <u>A</u> CGGGGCCATGACC	GGG→GGA	92

$$*T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

Table 3: Number and type of mutations found in our population of French-Canadians compared to the Caucasians screened by Simard *et al.* The allelic frequency of mutations is indicated between brackets.

Patients	R87Q	A251T	P307S
French-Canadian population (n = 96)	1 (0.52%)	3 (1.56%)	3 (1.56%)
Caucasian population ¹ (n = 95)	-	1 (0.53%)	1 (0.53%)

¹ [19]

REFERENCES

1. Adda S, Fleischmann BK, Freedman BD, Yu M, Hay DW, Kotlikoff MI (1996) Expression and function of voltage-dependent potassium channel genes in human airway smooth muscle. *J Biol Chem* 271:13239-13243.
2. Bérubé J, Chahine M, Daleau P (1999) Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflügers Arch* 438:419-422.
3. Caouette D, Dongmo C, Bérubé J, Fournier D, Daleau P (2003) Hydrogen peroxide modulates the Kv1.5 channel expressed in a mammalian cell line. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 398:479-486.
4. Choi WS, Khurana A, Mathur R, Viswanathan V, Steel DF, Fedida D (2005) Kv1.5 surface expression is modulated by retrograde trafficking of newly endocytosed channels by the dynein motor. *Circ Res* 97:363-371.
5. Clement-Chomienne O, Ishii K, Walsh MP, Cole WC (1999) Identification, cloning and expression of rabbit vascular smooth muscle Kv1.5 and comparison with native delayed rectifier K⁺ current. *J Physiol*. 515:653-667.
6. Drolet B, Simard C, Mizoue L, Roden DM (2005) Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drugbinding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 115:2209-2213.
7. Eldstrom J, Choi WS, Steel DF, Fedida D (2003) SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett* 547:205-211.
8. England SK, Uebele VN, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM (1995) A novel K⁺ channel β -subunit (hKv β 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 270:28531-28534.
9. England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM (1995) Characterization of a voltage-gated K⁺ channel β subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6309-6313.

10. Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM (1993) Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 73:210-216.
11. Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S (1998) Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *Am J Physiol* 275:H1717-H1725.
12. Fink M, Duprat F, Lesage F, Heurteaux C, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M (1996) A new K⁺ channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem* 271:26341-26348.
13. Li H, Guo W, Mellor RL, Nerbonne JM (2005) KCHIP2 modulates the cell surface expression of Kv1.5-encoded K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol* 39:121-132.
14. Overturf KE, Russell SN, Carl A, Vogalis F, Hart PJ, Hume JR, Sanders KM, Horowitz B (1994) Cloning and characterization of a Kv1.5 delayed rectifier K⁺ channel from vascular and visceral smooth muscles. *Am J Physiol* 267:C1231-C1238.
15. Rich TC, Snyders DJ (1998) Evidence for multiple open and inactivated states of the hKv1.5 delayed rectifier. *Biophys J* 75:183-195.
16. Rich TC, Yeola SW, Tamkun MM, Snyders DJ (2002) Mutations throughout the S6 region of the hKv1.5 channel alter the stability of the activation gate. *Am J Physiol* 282:C161-C171.
17. Robinson JM, Deutsch C (2005) Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron* 45:223-232.
18. Sewing S, Roeper J, Pongs O (1996) Kvβ1 subunit binding specific for Shaker-related potassium channel α subunits. *Neuron* 16:455-463.
19. Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM (2005) Polymorphism screening in the cardiac K⁺ channel gene *KCNA5*. *Clin Pharmacol Ther* 77:138-144.

20. Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB (1993) A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 101:513-543.
21. Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM (1991) Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J* 5:331-337.
22. Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ (1996) Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvβ2.1 subunits. *J Biol Chem* 271:2406-2412.
23. Wang Z, Fedida D (2002) Uncoupling of gating charge movement and closure of the ion pore during recovery from inactivation in the Kv1.5 channel. *J Gen Physiol* 120(2):249-60.
24. Wang Z, Fermini B, Nattel S (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 73:1061-1076.
25. Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA (1996) Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kvβ1 subunits. *J Biol Chem* 271:28311-28317.
26. Yang E-K, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K (2001) Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem* 276:4839-4844.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A, Sequence analysis of three *hKv1.5* SNPs found in French-Canadians. The corresponding peptide sequences are shown. **B,** Peptide sequences surrounding the mutation sites.

Figure 2. Representative recordings of current traces obtained from wild-type *hKv1.5* and R87Q, A251T and P307S variant-transfected CHO cells. Currents were elicited by 1.25 s depolarizing steps to varying test voltages between -30 mV and $+60$ mV in 10 mV increments from a holding potential of -80 mV. Cells were repolarized to -80 mV at the end of the voltage test. Note that the inactivation process is slower and less pronounced for R87Q and P307S variants compared to wild-type *hKv1.5* and A251T.

Figure 3. Current-voltage relationships constructed by plotting the normalized peak current amplitude against the membrane potential. I-V curves obtained for R87Q, A251T and P307S are compared to the I-V curve obtained from wild-type *hKv1.5*. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 8$ for the wild type, 6 for R87Q, 7 for WT/R87Q, 10 for A251T, 8 for P307S and 6 for WT/P307S). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

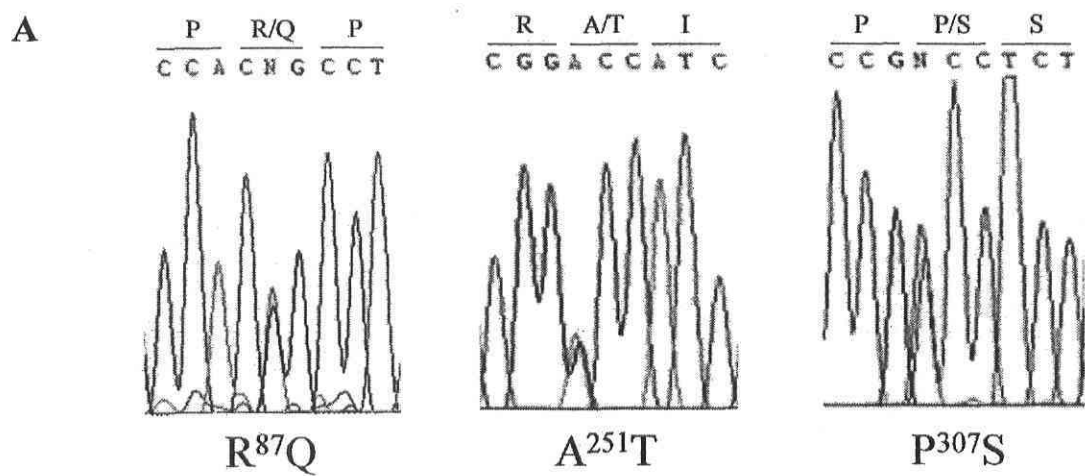
Figure 4. I-V relationships normalized (%) to their respective amplitude at $+70$ mV. Data are presented as mean \pm SEM; 'n' as in Figure 3.

Figure 5. The rapid time constant of the activating current kinetics is plotted against voltage step amplitude for wild-type *hKv1.5* and for each variant. Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 8, 6, 10$ and 8 respectively for *hKv1.5* wild-type and R87Q, A251T, P307S). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$. The faster activation process observed with the R87Q mutant expression is illustrated at the lower part of the figure. Activating current traces obtained during $+20$ and $+50$ mV depolarizing pulses for wild-type *hKv1.5* and R87Q were normalized to the amplitude at $t = 30$ ms.

Figure 6. The rapid component of the inactivation kinetics obtained from bi-exponential fittings is presented as a function of the pulse potential. Data obtained for each variant are compared to those obtained from hKv1.5 wild-type. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 8, 6, 10 and 8 respectively for hKv1.5 WT and R87Q, A251T, P307S). * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.005.

Figure 7. An action potential waveform (recorded *in situ* from a canine atrium in sinus rhythm) was used for voltage-clamp CHO cells. Current traces recorded in different cells transfected either with WT, R87Q or P307S were normalized to their respective maximum amplitude and superimposed.

FIGURES



B

R87Q: PGVRLPPLPEELPR/QPRRPPPEDEEEEGDP
A251T: WLIFEYPSSGSARA/TIAIVSVLVILISITFCL
P307S: PAPGANGSGVMAPP/SSGPTVAPLLPRTLAD

Figure 1

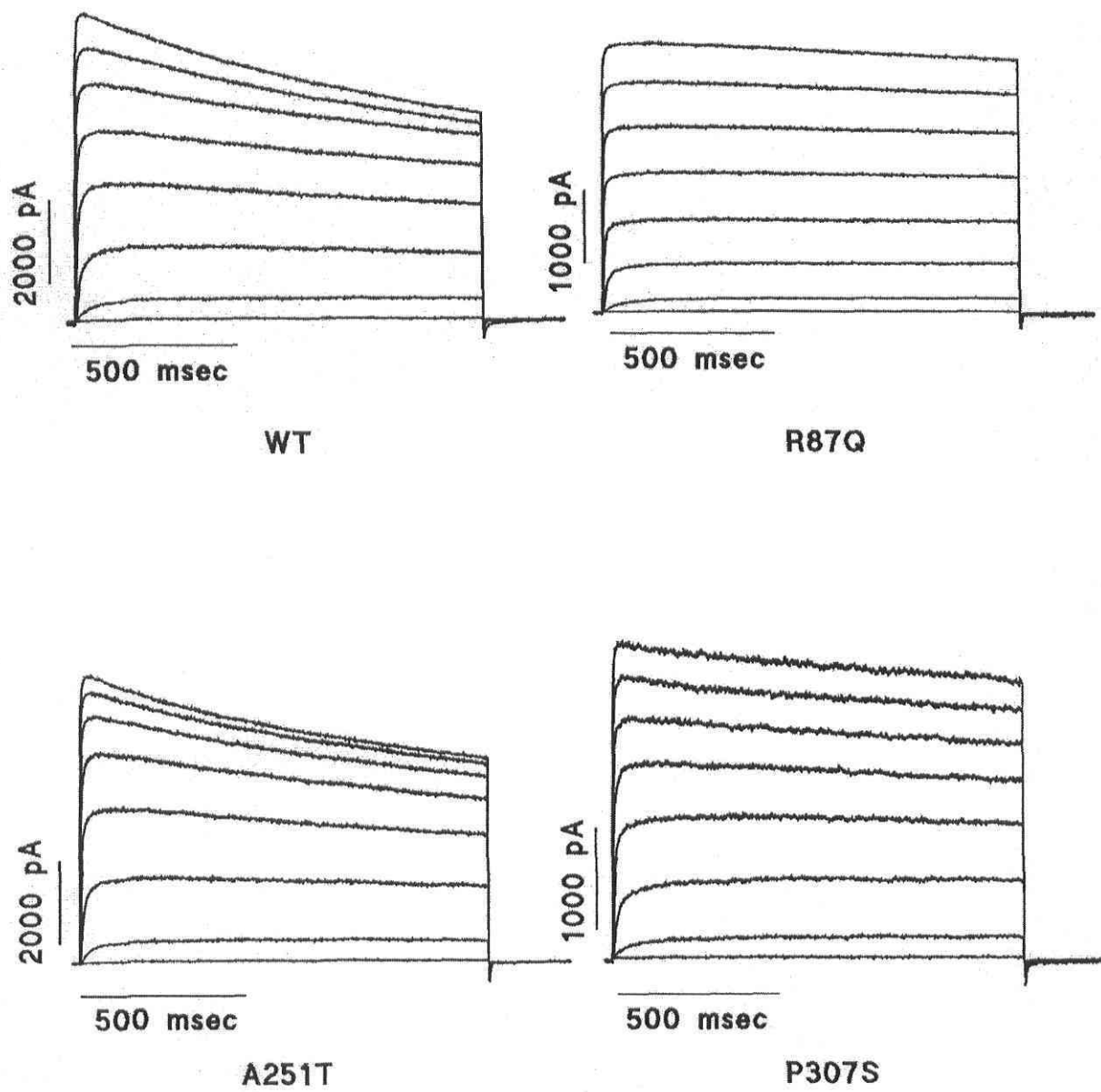


Figure 2

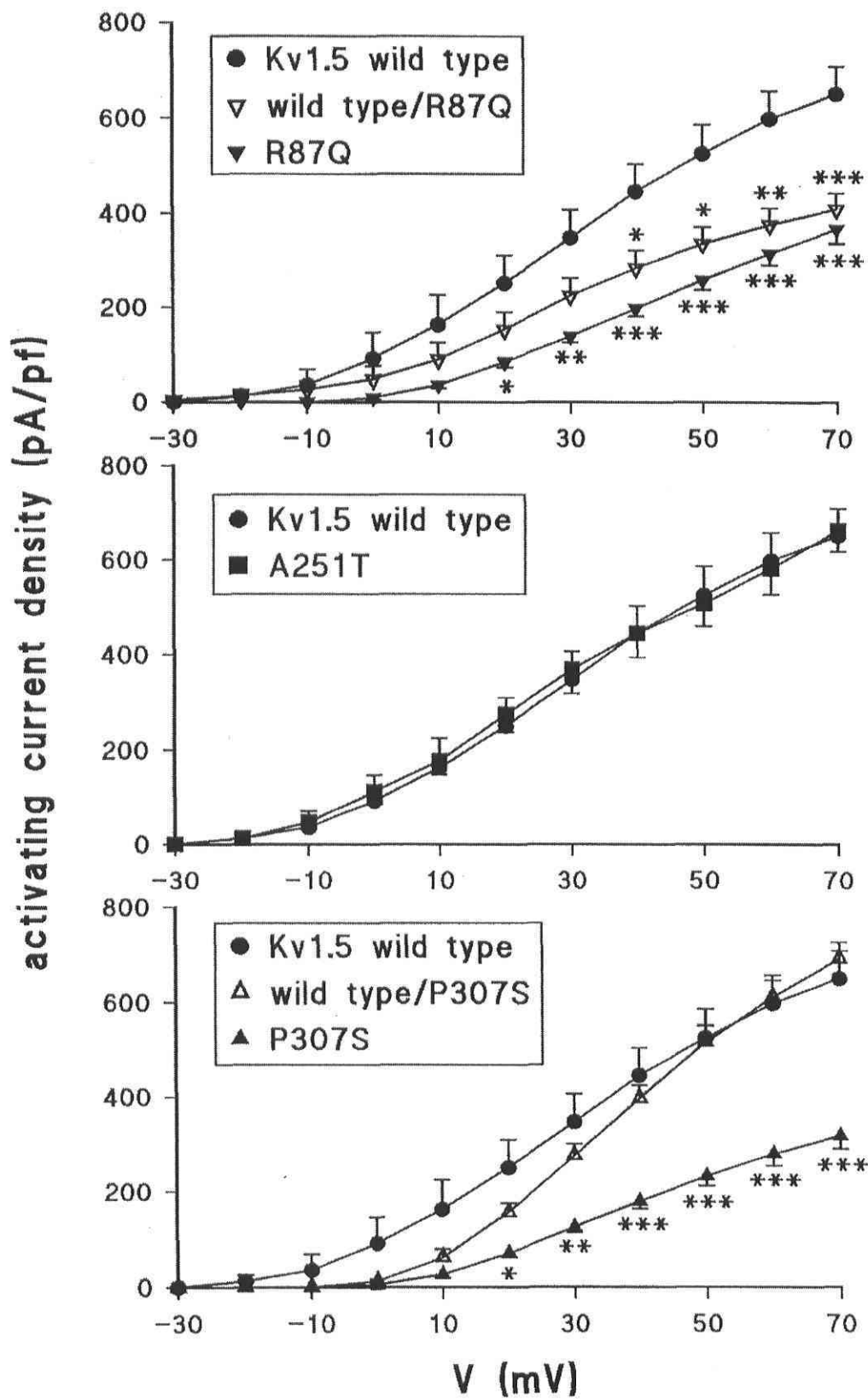


Figure 3

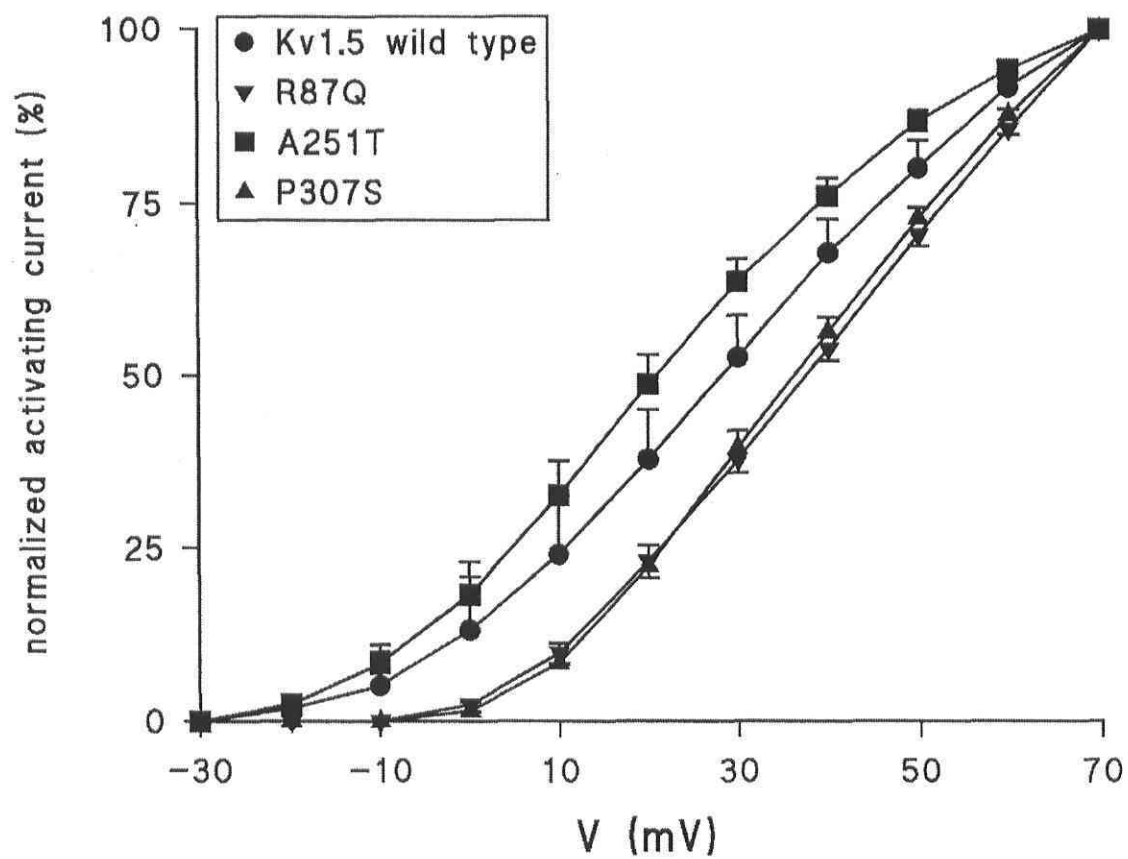


Figure 4

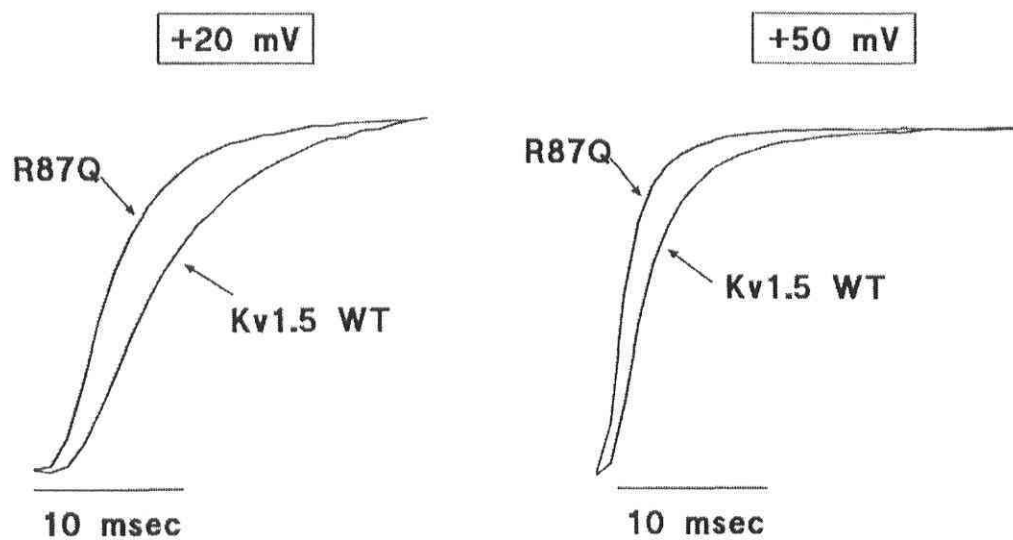
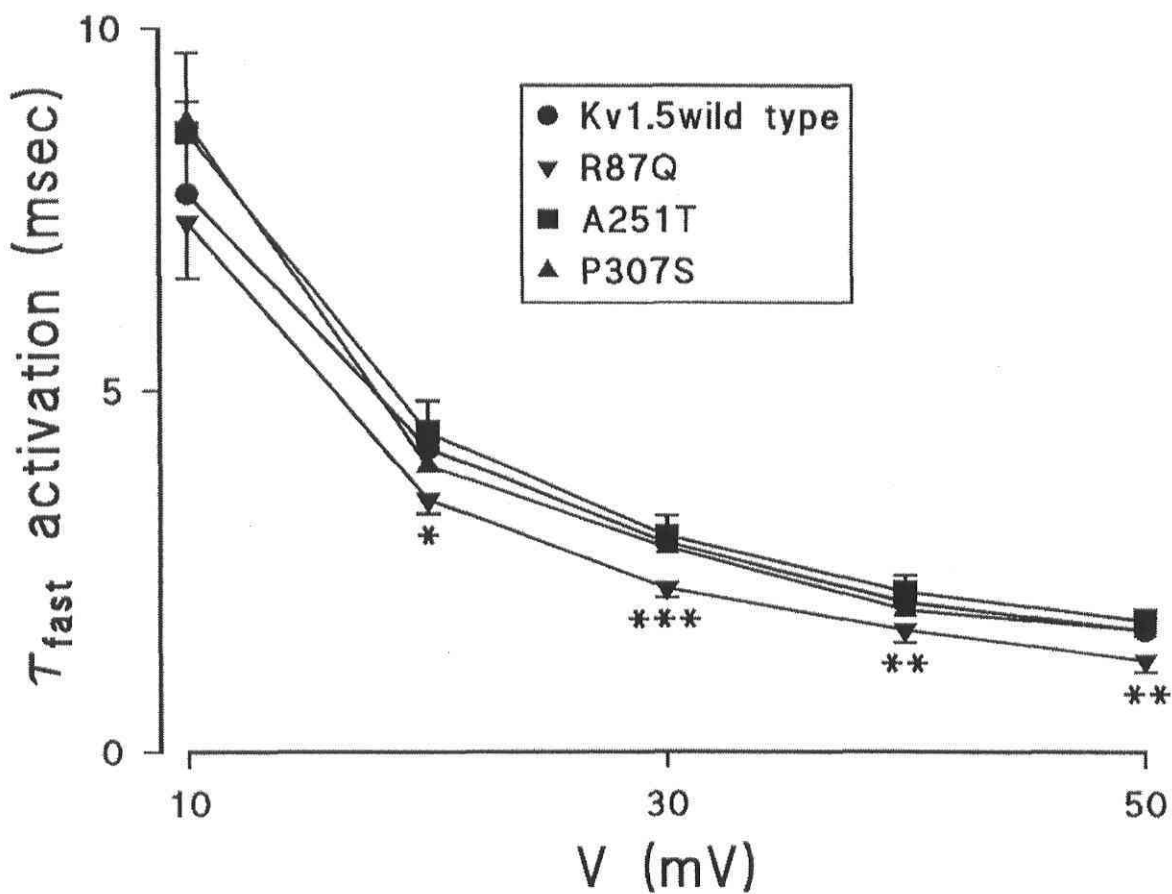


Figure 5

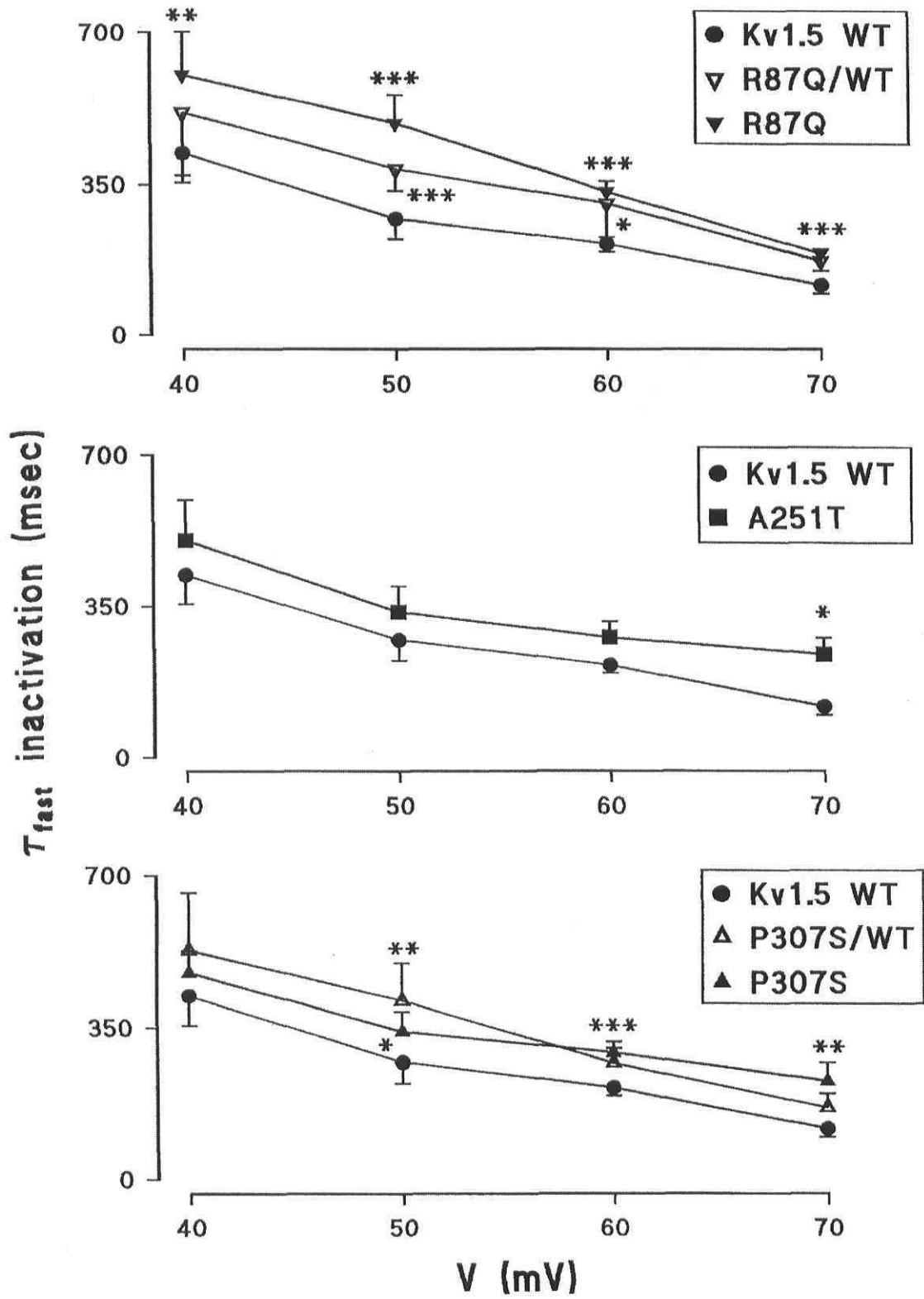


Figure 6

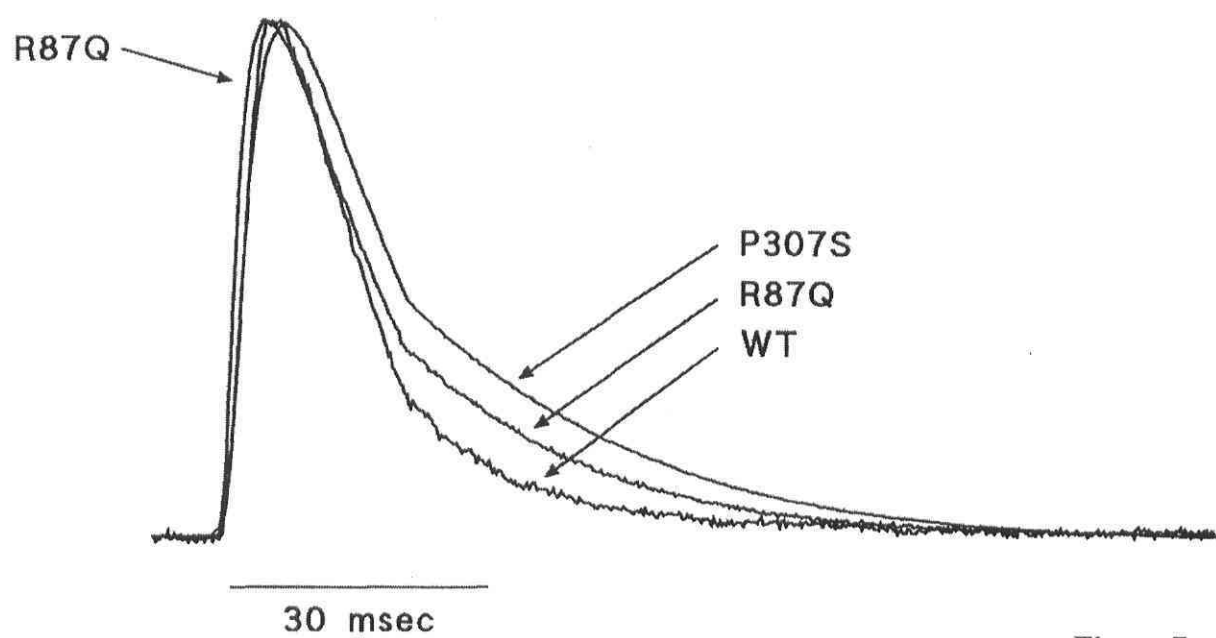


Figure 7

CHAPITRE 3

PREMIÈRE PARTIE:

MOLECULAR ANALYSIS OF hKV1.5 IN PATIENTS WITH PERSISTENT POST-SURGERY ATRIAL FIBRILLATION

Molecular analysis of hKv1.5 in patients with persistent post-surgery atrial fibrillation.

Isabelle Plante PhD^{1,2}, Dominique Fournier MSc¹, Patrick Mathieu MD^{1,3}, Pascal Daleau PhD^{1,2}

¹Quebec Heart Institute, Laval Hospital Research Center, Quebec, Canada, G1V 4G5

²Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec, Canada, G1K 7P4

³Department of Surgery, Laval University, Quebec, Canada, G1K 7P4

Correspondence to:

Pascal Daleau, PhD

Laval Hospital Research Center

2725 chemin Ste-Foy, Quebec, PQ, Canada, G1V 4G5

tel. 418-656-8711 ext. 5394

fax. 418-656-4509

e-mail: pascal.daleau@pha.ulaval.ca

Running title: hKv1.5 variants and post-operative atrial fibrillation

SUMMARY:

We recently identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *hKv1.5* in a French-Canadian population, which could shorten atrial action potential. We tested their presence among 185 post-coronary bypass patients and found a higher prevalence in patients with post-operative atrial fibrillation (AF) (6.25% vs 3.37%; $p=0.427$). Allelic frequencies for R87Q and P307S were 0.52% and 1.56% in the AF group vs 0% and 0.56% for non-AF group. We conclude that SNPs could be linked, when combined with other factors, to post-operative AF. Although it will be necessary to screen additional patients for these SNPs, this study helps to clarify the role of genetics in post-operative AF.

ABSTRACT

Background: Post-operative atrial fibrillation (AF) is a frequent complication following a cardiac surgery. Risk factors leading to the development of post operative AF are not well known and might be influenced by mutations of specific channels involved in atrial repolarization. Recently, we have identified three single nucleotide polymorphisms (SNPs) (R87Q, A251T and P307S) in the hKv1.5 channel in a French-Canadian population. Two of them, R87Q and P307S, modified the gating process and the expression level of hKv1.5. **Objectives:** Considering that these SNPs might accelerate atrial repolarization, we hypothesized that they could predispose to post-operative AF. **Methods:** We tested the presence of SNPs in the hKv1.5 channel among 185 patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) surgery. **Results:** In the post operative period, 96 patients (52%) developed a new onset of AF. Among patients who developed post-operative AF, we found a higher prevalence of SNPs when compared to the population without this post-operative arrhythmia (6.25% vs 3.37%; $p=0.42$). Respective allelic frequencies for R87Q and P307S were 0.52% and 1.56% in the post-operative AF group vs 0% and 0.56% for non-AF group. We also screened families of the carrier patients and found several members who carried the SNPs but did not show AF. The latter is not likely to be responsible for AF since it does not modify hKv1.5 channel functions. **Conclusion:** We identified a genetic background that might be involved in the occurrence post-operative AF. Therefore, R87Q and P307S polymorphism in hKv1.5, possibly in combination with other risk factors, might influence the development of post-operative AF.

KEY WORDS : Post-operative atrial fibrillation; single nucleotide polymorphism; potassium channels; hKv1.5.

RÉSUMÉ

Problématique: La FA post-opératoire est une complication fréquente suite à une chirurgie cardiaque. Les facteurs de risques menant au développement de la FA post-opératoire ne sont pas très bien connus et pourraient être influencés par des mutations dans des canaux ioniques spécifiques impliqués dans la repolarisation auriculaire. Récemment, nous avons identifié trois polymorphismes non-synonymes (SNPs) (R87Q, A251T, P307S) dans le canal hKv1.5 chez une population de Canadiens-Français. Deux d'entre eux, R87Q et P307S, ont modifié les propriétés électrophysiologiques et le niveau d'expression de hKv1.5. **Objectifs:** Considérant que ces SNPs pourraient accélérer la repolarisation auriculaire, nous avons émis l'hypothèse qu'ils pourraient prédisposer les patients à la FA post-opératoire. **Méthodologie:** Nous avons testé la présence des SNPs dans le canal hKv1.5 parmi 185 patients ayant subi un pontage coronarien. **Résultats:** Suite au pontage, 96 patients (52%) ont eu des épisodes de FA post-opératoire. Parmi ceux-ci, nous avons retrouvé une plus forte prévalence des SNPs comparativement aux patients n'ayant pas fait de FA (6,25% vs 3,37%; $p=0,42$). Les fréquences alléliques respectives pour R87Q et P307S étaient de 0,52% et 1,56% dans le groupe avec FA post-opératoire vs 0% et 0,56% pour le groupe sans FA. Nous avons aussi analysé les familles des patients porteurs de SNPs et avons retrouvé A251T et P307S chez plusieurs membres, mais aucun d'eux n'était atteint de FA. Il est peu probable que le SNP A251T soit associé à la FA, puisqu'il ne change pas les fonctions du canal. **Conclusion:** Nous avons identifié des éléments génétiques qui pourraient être impliqués dans le développement de la FA post-opératoire. Les polymorphismes R87Q et P307S du canal hKv1.5 pourraient possiblement, en combinaison avec d'autres facteurs de risques, influencer le développement de la FA post-opératoire.

MOTS-CLÉS: Fibrillation auriculaire post-opératoire; polymorphismes; canaux potassiques; hKv1.5

INTRODUCTION

With an incidence of 10 to 50% (1), atrial fibrillation (AF) is the most common complication following coronary artery bypass surgery (CABG). AF is associated with a two-fold increase in cardiovascular mortality (2) and morbidity (3). Factors predisposing to post-operative AF have been reported, such as advanced age (4), atrial ischemia (5), intracellular calcium overload (6) and a high level of expression of connexin-40 in atrial myocytes (7). In addition, Mandal *et al.* (8) reported an association between anti-HSP65 antibodies and post-operative AF, suggesting a possible role for antibody-mediated immune response in its pathogenesis.

Moreover, post-operative AF seems to be linked to oxidative stress and particularly to peroxynitrite production (9). The role of oxidative stress in the incidence of this pathology was confirmed by Carnes *et al.* (10), who demonstrated that ascorbate decreases the incidence of post-operative AF.

Gaudino *et al.* (11) demonstrated a close relation between the -174G/C Interleukin-6 promoter gene variant, the inflammatory response to surgery and the development of post-operative AF. Among 110 patients having undergone a coronary artery bypass grafting, they identified GG, CT and CC genotypes and found GG to be linked to higher post-surgery plasma levels of Interleukin-6 and increased post-operative incidence of AF, suggesting a genetic modulation of this pathology (11).

The gene *hKv1.5* encodes for the voltage-gated K⁺ channel hKv1.5, which was identified for the first time in myocytes from human heart by Fedida *et al.* (12). Recently, we found the heterozygous single nucleotide polymorphisms (SNPs) R87Q, A251T and P307S in this channel in a population of 96 French-Canadians (13). Electrophysiological analysis showed that the R87Q and P307S variants diminished the expression level of the channel and slowed its inactivation process in CHO cells. In addition, the variant R87Q accelerated the rate of hKv1.5 channel opening.

Considering the role of hKv1.5 in human atrial repolarization and that the electrophysiological properties of R87Q and P307S variants could potentially lead to abbreviation of the atrial action potential and effective refractory period durations, we

assessed the possibility that these SNPs could predispose to the development of post-operative AF following a cardiac surgery. We screened the *hKv1.5* gene of 185 patients having undergone a CABG, of which 96 had post-operative AF, and we found a higher, although non significant, prevalence of the R87Q and P307S SNPs among patients with post-operative AF.

METHODS

Patients enrolling

This study was carried out on 185 French-Canadians patients having undergone a CABG, of which 96 (52%) developed a new onset of post-operative episodes of AF significant enough to require a pharmacological treatment (i.e. episodes of >2h duration or recurrent episodes of AF). Exclusion criteria were: left ventricular ejection fraction <40%, age >65 year-old, chronic obstructive pulmonary disease, documented history of previous AF and peri-operative myocardial infarction. The present study was approved according to the ethical guidelines of Laval Hospital.

DNA preparation

Blood samples of patients were obtained from the GenetICQ tissue bank of the Quebec Heart Institute and genomic DNA was extracted from blood using the QIAamp DNA Blood Midikit protocol, as recommended by the manufacturer (QIAGEN, Mississauga, Canada).

PCR amplification and sequencing of Kv1.5

PCR primers (Table I) were initially selected in promoter and coding regions of *hKv1.5*, using the OLIGO primer analysis software (version 6.0; MBI, Cascade, USA) and oligos were synthesized by Medicorp Inc (Montreal, Canada). PCR amplifications were done on 50 ng of total DNA in a thermal cycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research, Toronto, Canada), with *Taq* (Promega, Madison, USA) and *Pfu Turbo*

(Stratagene, Vancouver, Canada) DNA polymerases according to the manufacturer's protocol. Samples were denatured for 5 minutes at 94°C and then cycled by denaturing 1 minute at 94°C, annealing 1 minute at 55°C and extending 2 minutes at 72°C (35 cycles). A final 10 minutes extension period was added.

PCR products were visualized and purified on an agarose gel stained with ethidium bromide and sequenced on both strands. Nucleotide sequence determinations were done at the Nucleic Acids Analysis and Synthesis Service, Laval University (Quebec, Canada) on an Applied Biosystem 3100 genetic analyzer (Perkin-Elmer, Mississauga, Canada) using the fluorescent dideoxy terminator sequencing protocol as recommended by the manufacturer. Electrophoretograms were visualized using Chromas software (version 1.45; Griffith University, Southport, Australia). Sequence comparisons between the wild-type and the *hKv1.5* gene of affected subjects were performed using CLUSTAL W (EMBL-EBI, Cambridge, UK).

Statistical analysis

A chi-square analysis was used in order to evaluate if the SNPs R87Q, A251T and P307S were significantly linked to post-CABG AF. The group of 96 patients with post-CABG AF was compared to the 89 post-CABG patients without AF and to a control population of 95 Caucasian patients (Simard C. *et al.*, 2005). A p value < 0.05 was considered for statistical significance. Values are presented as mean ± S.D.

RESULTS

Clinical characteristics of patients groups

The mean age of both groups was not significantly different (55±6 years for non-AF and 58±5 years for AF), as well as the gender distribution (77.5% males in non AF vs 86.5% in AF). Moreover, no difference was found between the mean left ventricular ejection fraction (64±12% in non AF vs 64±13% in AF).

Molecular analysis of hKv1.5 in patients

In the post-CABG AF group, we documented an increased incidence of SNPs when compared to patients without post-operative AF (6.25% vs 3.37%; $p=0.42$). Among the patients with post-operative AF we identified one patient with the R87Q and two with the A251T SNPs whereas the P307S SNP was found in three other patients. Among the post-CABG group without AF, only A251T and P307S were found respectively in two and one patient. All patients were heterozygous for these SNPs and respective allelic frequencies are presented in Table 2. Although the results are not statistically significant when studied individually, the allelic frequencies of the R87Q and P307S SNPs were higher among the post-CABG group with AF (0.52% and 1.56% respectively vs 0% and 0.56% in the non-AF group). We also compared the allelic frequencies between the AF group and a Caucasian population of 95 control patients without AF, of which *hKv1.5* was recently screened by Simard *et al.* (2005). A251T and P307S SNPs were identified in this population, with allelic frequencies of 0.53% for both (14). The p values for frequency of occurrence of R87Q, A251T and P307S in our post-CABG AF group compared to the non-AF group and this control population were 1.00, 0.87 and 0.63, respectively.

Molecular analysis of hKv1.5 in family members

We also tested the presence of SNPs in family members of carrier patients. Twelve members in three families were enrolled in the study and were screened for *hKv1.5*. The pedigrees of the three families are shown in the Figure. In the first family, the A251T SNP was present in a post CABG patient with AF (II.7 in the Figure) and in 3 of the 7 members which took part of the study. In the family 2, the same SNP was found in a post-CABG patient without AF (II.7) and in all of the three members enrolled. Finally, we identified P307S in one member of the family of a post CABG patient with AF (family 3 (II.6)). All the family members were heterozygous for these SNPs. As none of the family members for whom SNPs were screened have presented any documented episodes of AF, the presence of other factors might be necessary in order to trigger this arrhythmia.

DISCUSSION

We performed a molecular analysis of *hKv1.5* in 185 French-Canadians having undergone a CABG, of which 96 had post-operative episodes of AF. We have already characterized, in a French-Canadian population, the R87Q, A251T and P307S SNPs in this gene (13). These variants were found among post-CABG patients with AF, with a respective allelic frequencies of 0.52%, 1.04% and 1.56%. In the group without AF, the R87Q SNP was not identified, but the two other variants were encountered (allelic frequencies of 1.12% and 0.56% for A251T and P307S, respectively). Overall, we found a higher prevalence of SNPs among patients with post-operative AF, suggesting that genetic background might, with other concomitant factors related to surgery, predispose to the development of post-operative AF. Even though the sample size was not sufficient to establish statistical significance for each individual mutation, the results do indicate that these mutations may influence the development of post-operative AF. Indeed, these SNPs slow the inactivation process of the *hKv1.5* current and in addition R87Q accelerate the rate of channel opening (13). Thus, these mutations accelerate the atrial repolarization which must contribute to action potential shortening during AF.

To date, only a few genes, *KvLQT1* (15,16), *Kir2.1* (17) and *MiRPI* (18), were found to be associated with AF in a very limited number of patients. The effects of R87Q and P307S on *hKv1.5* channel properties suggest that these SNPs could be involved in the familial as well as the post-operative forms of AF. The A251T variant is not likely to be responsible for AF, since it does not modify the electrophysiological properties of *hKv1.5* (13). R87Q and P307S SNPs may not promote AF by themselves, but they could be implicated in the development of this disease in combination with other factors such as the oxidative stress related to surgery. Indeed, epidemiologic studies have shown that genetic and environmental factors can be implicated in the development of disease and that none of these isolated factors can independently promote the pathology (19,20). It has been shown that post-operative AF is associated with oxidative stress and particularly with peroxynitrite formation (9,10). A recent study has also shown that hydrogen peroxide increases the *hKv1.5* current amplitude at voltages corresponding to the action potential repolarisation phase and accelerate *hKv1.5* channel opening (21). Thus, the presence of R87Q and P307S

SNPs, in conjunction with other stress factors associated with surgery such as a burst of oxygen free radical release, could trigger post-surgery AF.

In conclusion, we found that the frequencies of SNPs were elevated in patients who developed post-operative AF following a CABG surgery. Thus, we propose that a genetic background associated with surgical related factors, which are poorly understood at the moment, predispose to the development of a new onset of post-operative AF. Though the problem of AF has been tackled by many researchers, it still remains unclear why some patients, even when they have no apparent risk factors, develop post-operative AF while others do not. Given the effects of R87Q and P307S on the electrophysiological properties of the hKv1.5 channel, these SNPs could be linked, when combined with other factors, to post-operative AF. However, it would be necessary to screen the *hKv1.5* gene of several additional hundreds of patients in order to establish this hypothesis. Such a study could be helpful in providing a better insight into the role of the genetic basis of AF in the post-operative period and, ultimately, in limiting the incidence of post-operative AF by improved and/or preventive treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR-MOP 64383), the Quebec Heart Institute and the Heart and Stroke Foundation of Canada (Dr. Pascal Daleau). Dr. Isabelle Plante was the recipient of a CIHR-Rx&D PhD studentship. We thank Dr. Laimonis Gailis for reviewing the manuscript. Dr. Patrick Mathieu is a research scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, Montréal, Canada.

REFERENCES

1. Fuller JA, Adams GG, Buxton B. Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. Is it a disorder of the elderly? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;97:821.
2. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998;98:946-52.
3. Chung MK, Martin DO, Sprecher D, et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;104:2886-91.
4. Levy S. Epidemiology and classification of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:S78-S82.
5. Kolvekar S, D'Souza A, Akhtar P, Reek C, Garratt C, Spyt T. Role of atrial ischaemia in development of atrial fibrillation following coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11:70-5.
6. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;85:428-36.
7. Dupont E, Ko Y, Rothery S, et al. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103:842-9.
8. Mandal K, Jahangiri M, Mukhin M, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 2004;110:2588-90.
9. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001;104:174-80.
10. Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, et al. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res* 2001;89:E32-E38.

11. Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, et al. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II195-III199.
12. Fedida D, Wible B, Wang Z, et al. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 1993;73:210-6.
13. Plante I, Fournier D, Ricard G, Drolet B, O'Hara G, Champagne J, Mathieu P, Baillot R, Daleau P. Electrophysiological characterization of three non-synonymous single nucleotide polymorphisms (R87Q, A251T, and P307S) found in hKv1.5. *Pflugers Arch* 2006;452:316-23.
14. Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K⁺ channel gene *KCNA5*. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:138-44.
15. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003;299:251-4.
16. Hong K, Piper DR, az-Valdecantos A, et al. De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res* 2005;68:433-40.
17. Xia M, Jin Q, Bendahhou S, et al. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:1012-9.
18. Yang Y, Xia M, Jin Q, et al. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;75:899-905.
19. Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994;344:1453-7.
20. van Asselt KM, Kok HS, van der Schouw YT, Peeters PHM, Pearson PL, Grobbee DE. Role of genetic analyses in cardiology: part II: heritability estimation for gene searching in multifactorial diseases. *Circulation* 2006;113:1136-9.

21. Caouette D, Dongmo C, Berube J, Fournier D, Daleau P. Hydrogen peroxide modulates the Kv1.5 channel expressed in a mammalian cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:479-86.

FIGURE LEGEND

Pedigrees of the families of three post-CABG patients carrying SNPs in *hKv1.5*. Squares represent males, circles are females and crosses designate deceased persons. Solid symbols are patients with post-CABG AF; in the family 2, the proband II.7 is a post-CABG patient without AF. S: Family members for whom the *hKv1.5* gene has been sequenced; A: A251T; P: P307S.

TABLES

Table 1. List of the primers used for PCR amplifications and sequencing.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	T _m (°C)*
Kv1.5-7F	GGAGGCGGCCAGAATGGGCAGC	76
Kv1.5-8R	CTGCCGGCTCCTCGTGATCCG	72
Kv1.5-9F	GTCCTCACCATTGCCCTGCCTG	72
Kv1.5-10R	CTCCCATTCCTACTCCACTGC	70
Kv1.5-12F	TTTGATCGCGCCAGCAAC	56
Kv1.5-13R	CCGGAGATGTTGATGTGGAC	62
Kv1.5-14F	AGGAGGAAGAAGGCGATCC	60
Kv1.5-17R	AAGATGGCCACCACATCGAT	60
Kv1.5-18F	AGCTGCTCGTGCGCTTCTT	60
Kv1.5-19R	GCTCCTCGTGATCCGTTTC	60

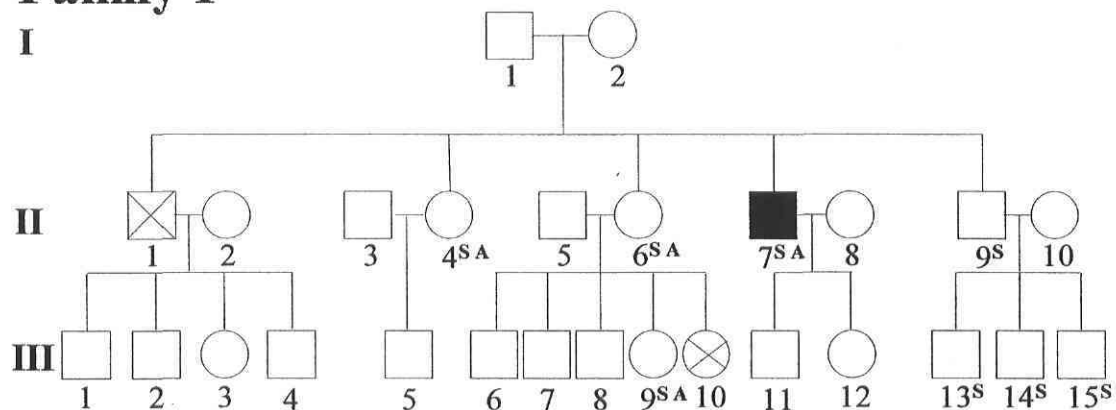
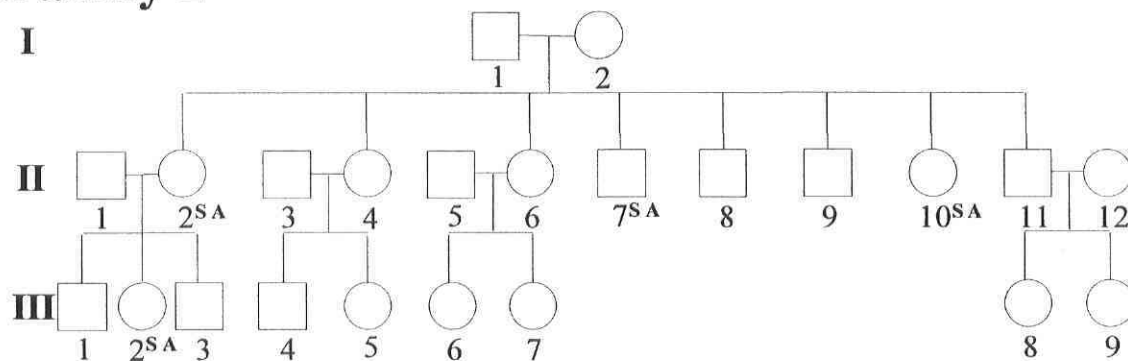
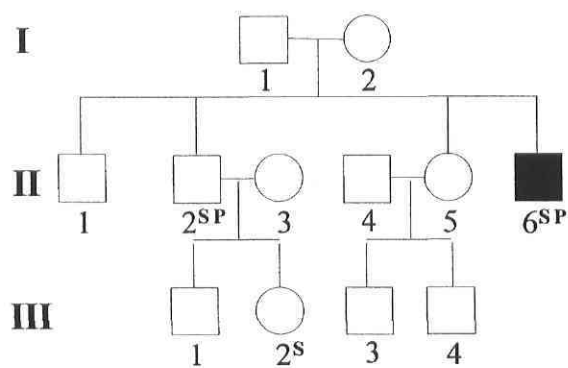
$$*T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

Table 2. Distribution of the R87Q, A251T and P307S SNPs of *hKv1.5* among a group of post-CABG patients with AF and without and in a control Caucasian population¹. The number of patients carrying SNPs is indicated in each group, as well as the allelic frequencies (in brackets).

Patients	R87Q	A251T	P307S
Post-CABG AF	1	2	3
(n = 96)	(0.52%)	(1.04%)	(1.56%)
Post-CABG without AF	0	2	1
(n = 89)	(0.00%)	(1.12%)	(0.56%)
Caucasian population	0	1	1
(n = 95) ¹	(0.00%)	(0.53%)	(0.53%)
	p = 1.00	p = 0.87	p = 0.63

¹Simard et al. (14)

FIGURE

Family 1**Family 2****Family 3**

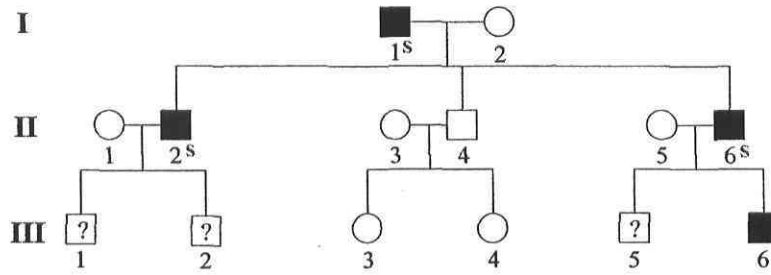
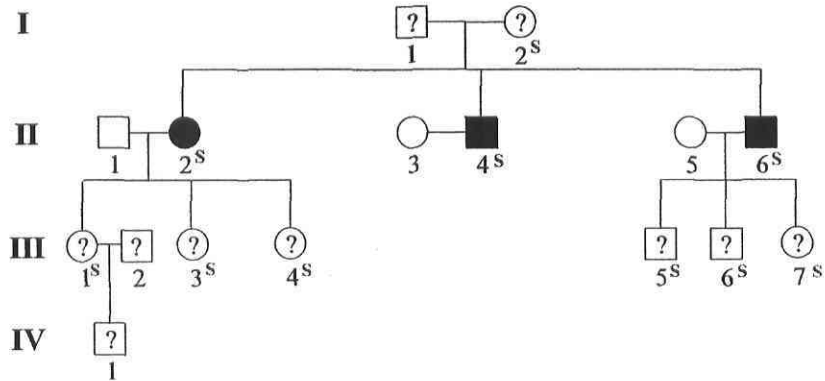
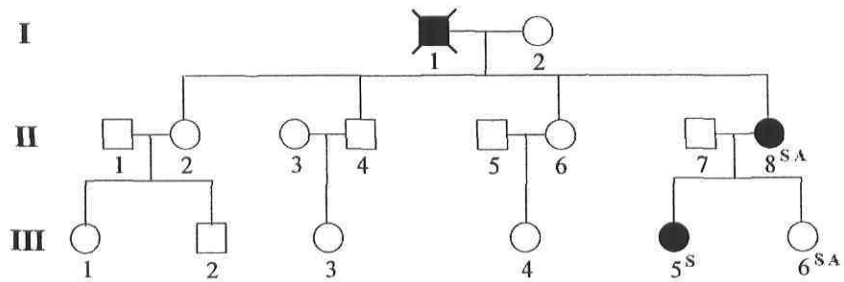
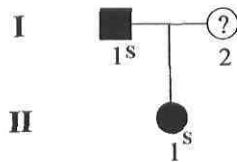
CHAPITRE 3

DEUXIÈME PARTIE:

RÔLE POTENTIEL DES POLYMORPHISMES R87Q, A251T ET P307S DANS L'INCIDENCE DE LA FA FAMILIALE.

Rôle potentiel des polymorphismes R87Q, A251T et P307S dans l'incidence de la FA familiale.

Dans le but d'évaluer le rôle potentiel des polymorphismes R87Q, A251T et P307S dans la pathogenèse de la FA familiale, nous avons étudié le gène *hKv1.5* chez quatre familles parmi lesquelles certains membres étaient atteints de cette pathologie. L'arbre généalogique de chacune d'elles est montré à la page suivante. Le gène ci-haut mentionné a été séquencé chez 18 patients parmi ces quatre familles et seul le polymorphisme A251T a été identifié au niveau du canal chez une mère atteinte de FA et sa fille non atteinte, dans la famille 3. Ainsi, selon nos résultats, il semble que la FA est attribuable à des gènes autres que *hKv1.5* pour ces familles. Pour ce qui est de la famille 3, il est peu probable que le polymorphisme A251T soit impliqué dans la pathogenèse de la FA étant donné qu'il ne modifie pas les propriétés électrophysiologiques du canal et qu'il a par ailleurs été identifié chez une patiente non atteinte.

Famille 1**Famille 2****Famille 3****Famille 4****Légende:**

□ = homme

○ = femme

? = diagnostic incertain

■ = personne décédée

s = gène *hKv1.5* séquencé

A = polymorphisme A251T

Arbres généalogiques des quatre familles analysées lors de l'étude sur la FA familiale et parmi lesquelles certains membres sont atteints de cette pathologie (symboles en noir).

Jusqu'à présent, la FA a été associée presque uniquement à des mutations de gain de fonction dans des gènes codant pour des sous-unités α ou β de canaux potassiques, tel qu'indiqué à la section 2.7 de l'introduction. De telles mutations tendent à raccourcir la durée du potentiel d'action auriculaire et de la période réfractaire efficace, ce qui indique que ce mécanisme devra être pris en considération dans le développement de nouveaux médicaments utilisés pour le traitement de la FA.

De nombreuses évidences indiquent que des mutations dans plusieurs gènes peuvent être impliquées dans le développement de la FA. Ainsi, les cas de FA familiale que nous avons étudiés pourraient impliquer des mutations dans d'autres gènes de canaux potassiques tels que *KCNQ1* ou *KCNJ2* ou dans le gène de la Cx40, *GJA5*.^{1,2,3}

Par ailleurs, il n'est pas exclu que les patients génotypés possèdent des polymorphismes héréditaires dans d'autres gènes, qui pourraient constituer des facteurs de risques importants de développement de la FA. Par exemple, des polymorphismes dans les gènes *eNOS* et *minK* ont été associés à la FA, bien que les mécanismes d'action ne soient pas très bien connus.⁴ On sait par contre que les polymorphismes retrouvés dans le gène *eNOS*, qui code pour la nitric oxide synthase endothéliale, diminuent l'expression de ce dernier,⁵ ce qui entraîne une augmentation de la densité du courant $I_{Ca,L}$,⁶ un mécanisme impliqué dans le développement de la FA.

En conclusion, le modèle de FA familiale est sans aucun doute très approprié pour tenter de mieux en comprendre les origines génétiques. En effet, il permet de génotyper des familles entières sur plusieurs générations et ainsi de déterminer de quelles façons les mutations ou polymorphismes potentiellement mis en cause sont transmis, un facteur important à considérer dans plusieurs pathologies. Cependant, malgré les nombreux efforts qui sont faits dans ce domaine, les cas de FA familiale sont rares, ce qui fait que les gènes déjà identifiés dans les familles peuvent ne pas représenter ceux qui seraient éventuellement les plus communément impliqués dans le développement de la maladie. En effet, les cas sporadiques ne suffisent pas à déterminer les origines génétiques précises d'une pathologie.⁷ Pour ce faire, il faut recruter de nombreuses familles sur plusieurs années et même en présence d'un nombre théorique suffisant de patients (déterminé statistiquement), l'établissement des bases génétiques de la FA peut demeurer incertain. Premièrement, de

telles études risquent de sous-estimer l'implication de certains gènes, tout d'abord parce que la pénétrance n'est pas toujours à 100%. Ensuite, comme la FA familiale commence souvent par être paroxystique, certains patients peuvent être considérés comme étant non affectés alors qu'ils sont en réalité atteints sans le savoir (par exemple, épisodes non récurrents de FA, légers ou asymptomatiques). D'autres patients peuvent aussi avoir les prédispositions génétiques mais commencer à souffrir de la maladie plusieurs années après la fin de l'étude, étant donné que la prévalence de la FA augmente avec l'âge. De plus, ces études sont souvent effectuées sur des patients d'un seul groupe ethnique, ce qui peut être limitant puisque le bagage génétique est variable d'un groupe à l'autre.⁸ Par contre, cela peut tout autant constituer un avantage d'homogénéité.

Enfin, l'analyse moléculaire du gène *hKv1.5* demeure une avenue fort intéressante dans l'étude de l'origine de la FA familiale étant donné le rôle important de ce gène dans la repolarisation auriculaire. Bien que les études effectuées dans le domaine aient toujours une part d'incertitude, l'analyse du gène *hKv1.5* chez plusieurs familles pourrait donner des résultats importants pour la compréhension de la FA. D'ailleurs, en juillet 2006, une mutation non-sens a été identifiée dans le gène *hKv1.5* et associée à la FA chez trois membres d'une famille dont deux étaient atteints de FA, le troisième ayant déjà eu des épisodes de palpitations typiques de la FA paroxystique. Cette mutation insère un codon stop à la position 375 du canal, ce qui élimine les segments S4 à S6 et la région COOH terminale en plus de diminuer l'amplitude du courant de 62%.⁹

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Firouzi M, Ramanna H, Kok B *et al.* Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res.* 2004;95:e29-33.
- (2) Juang JM, Chem YR, Tsai CT *et al.* The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2006 Jun 27.
- (3) Gollob MH, Jones DL, Krahn AD *et al.* Somatic mutations in the connexin 40 gene (*GJA5*) in atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2006;354:2677-88.
- (4) Fatini C, Sticchi E, Genuardi M *et al.* Analysis of *minK* and *eNOS* genes as candidate loci for predisposition to non-valvular atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 2006;27:1712-8.
- (5) Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M *et al.* T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999;99:2864-70.
- (6) Mery PF, Pavoine C, Belhassen L *et al.* Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem.* 1993;268:26286-95.
- (7) Puck JM, Straus SE. Somatic mutations: not just for cancer anymore. *N Engl J Med.* 2004;351:1388-90.
- (8) Ellinor PT, Yoerger DM, Ruskin JN *et al.* Familial aggregation in lone atrial fibrillation. *Hum Genet.* 2005;118:179-84.
- (9) Olsen TM, Alekseev AE, Liu XK *et al.* Kv1.5 channelopathy due to *KCNA5* loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2185-91.

CHAPITRE 4

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

La FA est une complication fréquente suite à une chirurgie cardiaque telle qu'un pontage coronarien. Elle est associée à des taux de mortalité et de morbidité considérables de même qu'à un coût médical élevé étant donné qu'elle prolonge la durée de l'hospitalisation.^{1,2} Il est donc d'une importance capitale de trouver des moyens efficaces de traiter cette forme d'arythmie et, mieux encore, de la prévenir. Cependant, notre compréhension actuelle de la pathogenèse de la FA ne nous permet pas encore de relever ces défis importants. Il est maintenant bien connu qu'une composante multigénique est impliquée dans le développement de la FA. Toutefois, bien que certaines mutations aient été identifiées chez des patients qui en sont atteints, aucune étude visant à détecter la présence ou l'absence de ces mutations chez un grand nombre d'individus souffrant de la maladie n'a été effectuée. De ce fait, aucun gène n'a encore pu être réellement associé à la FA. Les mutations rapportées dans la littérature comme étant potentiellement reliées à cette pathologie ont été identifiées seulement dans quelques familles et sur un nombre de patients insuffisant. C'est pourquoi il n'a jamais été possible, pour l'instant, d'établir un lien clair entre une mutation donnée et le développement de la FA.

La FA est attribuable entre autre à un raccourcissement de la phase de plateau du potentiel d'action de l'oreillette ainsi que de la période réfractaire efficace.^{3,4} Comme le courant I_{Kur} joue un rôle important dans la repolarisation auriculaire,⁵ nous avons émis l'hypothèse que des mutations ou des polymorphismes dans le canal potassique hKv1.5 pourraient modifier les propriétés électrophysiologiques de celui-ci et être impliqués dans la pathogenèse de la FA familiale ou idiopathique ou prédisposer à la FA post-opératoire. Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour premier objectif de faire une analyse moléculaire du canal potassique hKv1.5 chez une population de patients contrôles et d'autres atteints de FA (familiale, idiopathique ou post-opératoire). L'identification de polymorphismes non synonymes dans ce canal, chez certains de ces patients, a donné lieu au deuxième objectif, c'est-à-dire d'évaluer les effets de ces polymorphismes sur les propriétés électrophysiologiques de hKv1.5. Enfin, le troisième objectif de cette thèse était de tenter d'établir un lien entre ces polymorphismes et l'une ou l'autre des formes de FA. Rappelons brièvement que les mutations sont des variants très rares dans l'ADN, qui

changent les séquences peptidiques des protéines et qui sont souvent associées à des maladies congénitales telles le LQTS;⁶ les polymorphismes sont des variants communs dans l'ADN, qui changent (non-synonymes) ou ne changent pas (synonymes) la séquence peptidique. Notons cependant qu'un changement non-synonyme ne signifie pas nécessairement un changement fonctionnel au niveau de la protéine.

Identification et caractérisation de polymorphismes dans le canal hKv1.5

Le chapitre 2 présente une étude portant sur la caractérisation électrophysiologique de polymorphismes non-synonymes dans le gène *hKv1.5*.⁷ Nous avons d'abord extrait l'ADN génomique de 96 patients Canadiens-Français à partir d'échantillons sanguins prélevés dans la banque GenetiCQ de l'Institut de Cardiologie de Québec. À l'aide de la technique de réaction en chaîne de la polymérase, nous avons amplifié la séquence codante du gène *hKv1.5* ainsi que la région promotrice présumée (-83 bp).⁷ Cependant, dans les faits, la région promotrice est certainement plus étendue que celle que nous avons analysée. En effet, une étude a démontré, par extension d'amorces, la présence de sites potentiels d'initiation de la transcription de *Kv1.5* à environ 220, 360 et 700 pb avant l'ATG dans le cœur de rat⁸ et la séquence promotrice du gène pour cette espèce était déjà connue⁹ lorsque nous avons amorcé notre étude. Par contre, les connaissances au sujet de la séquence du gène *Kv1.5* de l'humain (*hKv1.5*) étaient beaucoup plus restreintes. La seule séquence disponible à l'époque en était une d'ADNc (numéro d'accèsion NM_002234 sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) qui débutait seulement 230 pb avant l'ATG, ce qui ne laissait pas beaucoup de latitude pour le choix d'une amorce fonctionnelle dans cette région (%GC adéquat, pas de séquences inversées répétées, Tm pas trop élevé, etc.).

Quoi qu'il en soit, le séquençage direct d'amplicons nous a permis d'identifier les polymorphismes non synonymes R87Q, A251T et P307S chez respectivement 1, 3 et 3 des 96 patients.⁷ Ces derniers se trouvent respectivement dans l'extrémité NH₂-terminale, le segment transmembranaire S1 et la première boucle extracellulaire du canal hKv1.5. Il s'agit vraisemblablement de polymorphismes plutôt que de mutations pour deux raisons. Premièrement, les polymorphismes A251T et P307S ont récemment été identifiés parmi une population contrôle de Caucasiens.¹⁰ Deuxièmement, tel que mentionné dans la section

des résultats du manuscrit présenté au chapitre 2, un alignement de gènes *Kv1.5* de différentes espèces a permis de détecter, chez certaines d'entre-elles, la présence de deux des trois polymorphismes que nous avons identifiés. Par exemple, Q87 a été retrouvé chez un gène *Kv1.5* de furet et trois de lapin. Ce polymorphisme, de même que S307, a également été rencontré chez quatre gènes *Kv1.5* de souris et un de rat. Le polymorphisme T251 n'était présent ni chez les gènes humains ni chez ceux des autres espèces, mais seulement 16 gènes ont été étudiés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les polymorphismes R87Q, A251T et P307S ont été reproduits par mutagenèse dirigée et les canaux hKv1.5 variants ont été exprimés dans une lignée de cellules CHO. Enfin, la technique de patch-clamp en configuration cellule entière a permis d'étudier les propriétés d'ouverture et de fermeture du canal sauvage et des variants. Brièvement, cette technique consiste à approcher une micropipette de la cellule jusqu'à ce qu'elle touche la membrane, à provoquer une légère dépression afin de créer un scellement étanche et enfin, à percer la membrane cellulaire en appliquant une dépression additionnelle. La micropipette utilisée lors de cette technique contient un liquide dont la composition est semblable à celle du cytoplasme. Ainsi, en perçant la membrane, le liquide de la micropipette se mélange au cytoplasme de la cellule et cela permet d'enregistrer, suite à l'imposition de différents voltages, les courants produits par les canaux exprimés dans la cellule entière.

Le canal hKv1.5 sauvage produit un courant qui s'active rapidement à partir d'un voltage d'environ -10 mV et qui s'inactive lentement, à des voltages $\geq +10$ mV. Le courant produit par A251T était semblable à celui du canal sauvage. Cependant, nous avons remarqué une forte diminution de la densité de courant ainsi que de l'amplitude de l'inactivation chez les variants R87Q et P307S. De plus, nous avons également noté que le canal porteur du polymorphisme R87Q s'ouvrait plus rapidement. Par ailleurs, nous avons soumis les cellules transfectées à un protocole de "potentiel d'action imposé", qui a été conçu pour imiter un potentiel d'action auriculaire. Les résultats obtenus à l'aide de ce protocole ont permis de confirmer les effets observés sur l'activation et l'inactivation du canal hKv1.5 en présence des polymorphismes R87Q et P307S. Nous avons démontré que ces derniers pourraient potentiellement augmenter le courant total produit par hKv1.5/ I_{Kur} .

lors d'un potentiel d'action. Ensuite, comme tous les polymorphismes identifiés étaient à l'état hétérozygote, nous avons co-transfecté chacun des canaux variants R87Q et P307S avec le canal sauvage dans les cellules CHO. Le phénotype sauvage a été restauré avec la combinaison canal sauvage-P307S, mais la co-expression du canal sauvage avec le variant R87Q a donné lieu à un phénotype intermédiaire, démontrant un caractère plutôt dominant pour R87Q contrairement à P307S. Notons qu'il ne serait pas tout à fait exact de parler d'effet dominant négatif pour R87Q, puisque généralement, dans un tel cas, ce variant aurait probablement démontré peu ou pas d'activité comparativement au canal sauvage. En effet, la co-expression d'un dominant négatif avec la protéine sauvage en diminue généralement les fonctions de beaucoup plus de 50%.

Il n'a malheureusement pas été possible d'évaluer si chaque cellule analysée avait réellement un ratio 1:1 lors des expériences de co-expression; cela constitue une limite de notre étude. En effet, il est possible que les cellules soumises au patch-clamp exprimaient en général un peu plus du canal variant que de la protéine sauvage dans le cas de R87Q et inversement pour ce qui est de P307S. Il se peut également que les ratios aient été variables pour chacune des co-expressions. Quelques-uns des résultats obtenus semblent aller dans le sens de cette hypothèse. Par exemple, si on regarde les courbes des constantes de temps rapides d'inactivation en fonction du voltage (chapitre 2, figure 6, page 166), on peut voir que la co-expression du variant P307S avec le canal hKv1.5 sauvage restaure le phénotype de ce dernier sauf à +50 mV, où la constante de temps est encore plus élevée que celle du variant P307S seul. Ce résultat inattendu pourrait aussi être attribuable à une limite du processus de modélisation, qui peut justement survenir à des voltages inférieurs à +50 mV. En effet, le canal hKv1.5 a très peu d'inactivation et celle-ci commence à paraître aux environs de +40 mV et parfois à +50mV. Or, la modélisation bi-exponentielle que nous avons effectuée dans le cas présent est d'autant plus exacte que l'inactivation est prononcée. Ainsi, en présence d'une inactivation très faible, cette forme de modélisation peut parfois donner des résultats erronés. Néanmoins, il semble que le variant P307S influence les propriétés électrophysiologiques, même en co-expression avec le canal sauvage. En effet, si on regarde le bas de la figure 3 du chapitre 2 (page 163), on voit que la courbe d'activation du variant P307S est décalée vers des voltages plus positifs. Lorsque P307S est co-exprimé avec la protéine sauvage, le décalage demeure présent pour des

voltages inférieurs à +50 mV seulement. Ces résultats semblent indiquer qu'à ces voltages, P307S a une influence sur les propriétés électrophysiologiques du canal, mais que son effet est annulé à des voltages plus élevés. Même si on considère le fait que les niveaux d'expression des canaux P307S et sauvage aient pu varier d'une cellule à l'autre, ce décalage de la courbe semble vraisemblablement être attribuable au variant P307S. En effet, si ce dernier n'avait eu aucune influence sur les propriétés électrophysiologiques du canal, des niveaux d'expression variables de P307S et de la protéine sauvage auraient donné lieu à des courbes ayant des barres d'erreurs plus grandes et possiblement sans différences significatives.

Enfin, le canal sauvage et chacun des variants (sans co-expression avec hKv1.5) ont été transfectés dans une lignée de cellules HEK293 et caractérisés en patch-clamp, mais tous ont montré des propriétés électrophysiologiques semblables.⁷ L'intérêt d'utiliser deux systèmes d'expression (cellules CHO et HEK293) était d'étudier l'effet de la sous-unité β sur les canaux porteurs des polymorphismes. Trois sous-unités β sont connues pour interagir avec l'extrémité NH₂-terminale de hKv1.5, soient Kv β 1.2, Kv β 1.3 et Kv β 2.1. Ces dernières modulent l'inactivation du canal.¹¹⁻¹³ Les cellules CHO expriment la sous-unité Kv β 2.1, contrairement aux HEK qui n'expriment pas de sous-unités β .¹² Les caractéristiques électrophysiologiques anormales induites par les polymorphismes R87Q et P307S semblent dépendre de la présence de la sous-unité β , puisqu'elles n'ont été observées que dans les cellules CHO. Une étude a mis en évidence que le canal hKv1.5 s'associe à des sous-unités β dans le cœur humain,¹⁴ ce qui signifie que les phénotypes causés par la présence des polymorphismes R87Q et P307S pourraient s'exprimer dans le myocarde. Des études ont rapporté que Kv β 1.2, Kv β 1.3 et Kv β 2.1 augmentent l'amplitude et la vitesse de l'inactivation de hKv1.5.^{12,15,16} Par ailleurs, l'inactivation rapide de hKv1.5 induite par Kv β 1.3 implique un blocage du canal à l'état ouvert par l'extrémité NH₂-terminale de la sous-unité β .¹² Nous avons précédemment mentionné que les polymorphismes R87Q et P307S, qui diminuent l'amplitude de l'inactivation, sont situés respectivement dans l'extrémité NH₂-terminale et la première boucle extracellulaire.⁷ Ces résultats suggèrent donc que des portions de hKv1.5, autres que le pore, sont impliquées dans l'inactivation. Il a été démontré que les acides aminés 112 à 201 de l'extrémité NH₂-

terminale étaient importants pour la liaison de la sous-unité α aux sous-unités β .¹¹ D'autres études mentionnent que les 200 premiers acides aminés sont importants.^{17,18} Ainsi, il est possible que R87Q, qui est situé près de cette région, déstabilise l'interaction α/β . Il se peut que P307S modifie aussi le lien à la sous-unité β , bien que ce polymorphisme ne soit pas dans l'extrémité NH₂-terminale. Nos résultats semblent donc indiquer que la première boucle extracellulaire est elle aussi impliquée dans le processus d'inactivation.

Notre étude a démontré que le polymorphisme R87Q accélère les cinétiques d'ouverture de hKv1.5.⁷ Cet effet était plutôt imprévisible, puisque les régions impliquées dans l'activation de hKv1.5 sont le segment S4 et la portion S5-pore-S6.¹⁹ Cependant, selon une autre étude, le canal hKv1.5 passe par plusieurs états fermés avant de s'activer.²⁰ Ainsi, il est possible que la présence du polymorphisme R87Q interfère avec ces états.

Pour ce qui est de la diminution de la densité de courant observée avec R87Q et P307S, celle-ci pourrait, comme le ralentissement de l'inactivation, être attribuable à une altération de la liaison du canal à la sous-unité β . Le fait que les densités de courant du canal sauvage et des variants demeuraient inchangées, lorsque exprimés dans les cellules HEK293, va en faveur de cette hypothèse. Il a été démontré, en effet, que la liaison entre le canal potassique Kv2.2 et la sous-unité mKv β 4, dans le cerveau de souris, augmentait la stabilité et la distribution subcellulaire du canal.²¹ Des résultats semblables ont été observés avec les sous-unités Kv β 1.1 et Kv β 2.1 en présence du canal Kv4.3 du cerveau du rat.²² Il semble que l'interaction de la sous-unité β avec les sous-unités α aurait lieu dès le début de la biosynthèse, ce qui augmenterait la stabilité de ces dernières et favoriserait leur transport vers la surface de la cellule.²³ Aucune étude n'a rapporté qu'une sous-unité β particulière augmentait le niveau d'expression de surface de hKv1.5. Cependant, étant donné ce qui est rapporté dans la littérature au sujet du rôle de chaperone des sous-unités β auprès d'autres canaux potassiques, il est possible que les sous-unités β exprimées dans le cœur aient un effet semblable sur hKv1.5.

Comme les sous-unités β , le domaine de tétramérisation (T1) des canaux potassiques dépendants du voltage sert lui aussi de chaperone lors de leur biosynthèse. Il se forme très tôt, alors même que le canal est encore attaché à la membrane du réticulum

endoplasmique.^{24,25} Il est impliqué dans la stabilisation du canal et il régule son expression à la surface cellulaire.²⁶ Ce domaine est hautement conservé chez les canaux potassiques dépendants du voltage.²⁷ D'une longueur d'environ 120 acides aminés, il est situé dans la portion NH₂-terminale du canal, juste avant le segment transmembranaire S1 (acides aminés 120 à 240).²⁷ Cependant, il est peu probable que la diminution de l'expression de surface du canal observée en présence des polymorphismes R87Q et P307S soit en lien avec le domaine T1, puisque ces polymorphismes sont situés relativement loin de ce domaine.

Par ailleurs, une étude récente a démontré que le niveau d'expression de surface du canal Kv1.5 du rat, dans une lignée de cellules HEK293 transfectée comme dans des myocytes auriculaires, était modulé par une interaction avec le complexe dyneine-dynactine.²⁸ Celui-ci est impliqué dans le transport des endosomes de la surface vers l'intérieur de la cellule et son inhibition augmenterait le niveau d'expression de Kv1.5 par un blocage de l'endocytose et une redistribution des canaux à la surface cellulaire.²⁹ Dans l'étude de Choi *et al.*,²⁸ la délétion des acides aminés 65 à 93 a éliminé l'effet modulateur du complexe dyneine-dynactine. Or, un fait intéressant est que le polymorphisme R87Q est situé dans cette région. De plus, il semble que la phosphorylation de résidus tyrosine sur le canal Kv1.5, qui est d'ailleurs reconnue pour diminuer l'amplitude du courant,³⁰ soit nécessaire à l'action du complexe dyneine-dynactine.²⁸ La région située entre les acides aminés 65 et 93 est riche en proline et possède deux sites consensus SH3 (RPLPPLP) de liaison à la tyrosine kinase *src*.³¹ En introduisant des mutations dans le deuxième site (RPLPPLP → RPLAALP), Choi *et al.*²⁸ ont obtenu les mêmes résultats qu'en délétant les acides aminés 65 à 93. Ces résultats démontrent que le deuxième site SH3, qui est situé seulement 5 acides aminés avant R87, est particulièrement impliqué dans la modulation de l'expression de surface par le complexe dyneine-dynactine. Le polymorphisme R87Q pourrait donc possiblement interférer avec la phosphorylation par la tyrosine kinase *src*.

Enfin, il est beaucoup plus facile d'émettre des hypothèses pouvant expliquer les changements de propriétés électrophysiologiques induits par R87Q que ceux occasionnés par P307S. En effet, il est maintenant bien connu que la région NH₂-terminale est importante dans la régulation de nombreuses fonctions des canaux potassiques dépendants

du voltage, dont l'inactivation et l'expression de surface tel que mentionné plus haut, et aussi l'assemblage en un canal fonctionnel.³² Cependant, aucune étude n'a rapporté de rôle particulier de la première boucle extracellulaire (où est situé P307S) dans la modulation de ces fonctions. Cependant, le fait que le polymorphisme P307S ait des effets semblables à ceux de R87Q suppose que la première boucle extracellulaire pourrait moduler l'amplitude de l'inactivation et le niveau d'expression du canal à la surface cellulaire, au même titre que l'extrémité NH₂-terminale.

Pour ce qui est de A251T, qui est situé dans le segment transmembranaire S1, l'absence d'effets électrophysiologiques de ce polymorphisme sur hKv1.5 pourrait signifier que l'alanine en position 251, n'a pas de rôle majeur dans les fonctions du canal. En effet, ce segment ne semble pas particulièrement impliqué dans les processus d'activation et d'inactivation, mais une étude a cependant démontré qu'il était très important pour l'assemblage du canal.³³ Toutefois, le polymorphisme A251T paraît ne pas influencer le processus d'assemblage, puisqu'il n'a pas entraîné une diminution de l'amplitude du courant comme l'ont fait R87Q et P307S dans les cellules CHO.

Les résultats de l'étude décrite au chapitre 2 nous guideront potentiellement vers une meilleure compréhension du fonctionnement du canal potassique hKv1.5. Ils constituent, par ailleurs, une autre preuve que des polymorphismes peuvent interférer avec l'expression et les propriétés de gènes et de protéines. Ces résultats démontrent également que certains polymorphismes pourraient potentiellement être impliqués dans la pathogenèse de diverses maladies telles que la FA, dans le cas des polymorphismes R87Q et P307S. Bien que l'inactivation de hKv1.5 se développe lentement, le degré d'inactivation du canal au début d'un potentiel d'action dépend du temps relatif pendant lequel la cellule se trouve à des voltages de dépolarisation. Lors de la FA, les myocytes auriculaires se retrouvent fréquemment à des voltages élevés, ce qui suggère qu'une inactivation substantielle du canal hKv1.5 est présente. Ainsi, des différences dans la vitesse et le degré de l'inactivation peuvent avoir des conséquences directes sur la repolarisation auriculaire.¹⁴ Par ailleurs, comme l'inactivation de hKv1.5 est fortement diminuée en présence de R87Q et P307S et que R87Q augmente la vitesse d'activation du canal, ces polymorphismes

pourraient tendre à créer une repolarisation plus rapide de l'oreillette et à diminuer la durée du potentiel d'action auriculaire et de la période réfractaire efficace.

Lien entre les polymorphismes identifiés dans le canal hKv1.5 et l'incidence de la FA post-opératoire

Dans l'étude présentée au chapitre 3, nous avons tenté d'établir un lien entre les polymorphismes R87Q, A251T et P307S du canal hKv1.5 et l'incidence de la FA post-opératoire. Nous avons fait l'analyse moléculaire du gène *hKv1.5* de 185 patients Canadiens-Français ayant subi un pontage coronarien, desquels 96 ont eu des épisodes de FA post-opératoire assez importants pour nécessiter un traitement pharmacologique. Les trois polymorphismes ci-haut mentionnés ont été identifiés parmi ces 96 patients, à des fréquences alléliques respectives de 0,52%, 1,04% et 1,56%. Nous n'avons pas retrouvé le polymorphisme R87Q chez les patients qui n'ont pas fait de FA suite au pontage, mais A251T et P307S étaient présents à des fréquences alléliques de 1,12% et 0,56%, respectivement. Bien qu'aucun des polymorphismes n'ait pu être relié de façon significative à la FA post-opératoire ($p = 1,00$, $0,87$ et $0,63$ pour R87Q, A251T et P307S, respectivement), la prévalence des polymorphismes R87Q et P307S était plus élevée parmi le groupe de patients atteints de cette pathologie.

On rapporte, dans la littérature, que des polymorphismes peuvent induire une variabilité dans le phénotype de certaines maladies. Un exemple récent est la découverte du polymorphisme S1102Y dans le canal sodique SCN5A. Ce dernier est présent chez environ 10% des Noirs et il semble conférer une susceptibilité aux arythmies cardiaques telles que le long QT.³⁴ Ensuite, selon une autre étude, le polymorphisme commun K897T, dans le canal potassique HERG, serait associé à un allongement de l'intervalle QT chez des femmes Finlandaises d'âge mûr.³⁵ Par ailleurs, tel que mentionné à la section 3.6.2 du chapitre 1, certaines études suggèrent une modulation génétique de la FA post-opératoire. Ainsi, étant donné que R87Q et P307S diminuent l'inactivation du canal hKv1.5 et que R87Q augmente la vitesse d'activation,⁷ il serait possible que ces polymorphismes prédisposent à la FA post-opératoire puisqu'ils tendent à réduire la durée de la repolarisation auriculaire. Le fait que ces deux polymorphismes entraînent une diminution

de la densité du courant, lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules CHO, semble aller à l'encontre de leur implication possible dans la pathogenèse de la FA. Cependant, nous ne connaissons pas la contribution de chacune des caractéristiques électrophysiologiques de ces polymorphismes dans l'expression du phénotype. Il n'est donc pas exclu que, globalement, R87Q et P307S tendent à raccourcir la durée du potentiel d'action *in vivo*.

Pour ce qui est de A251T, il est peu probable que ce polymorphisme ait un lien direct ou indirect avec le développement de la FA post-opératoire, compte tenu du fait qu'il n'affecte pas les propriétés électrophysiologiques du canal.⁷ Par ailleurs, la seule présence de R87Q et P307S dans le canal hKv1.5 n'est possiblement pas suffisante pour déclencher la FA. Cependant, ces polymorphismes pourraient y être reliés de façon indirecte, en combinaison à d'autres facteurs comme le stress oxydatif relié à l'âge ou à une chirurgie. Il a été démontré que la FA était associée au stress oxydatif et particulièrement à la formation de peroxy-nitrite.³⁶ Ce dernier provoque la nitration sélective des résidus tyrosine des protéines et déstabilise le contrôle énergétique de la cellule.^{37,38} Carnes *et al.*³⁹ ont par la suite observé que l'ascorbate réduisait de moitié l'incidence de la FA post-opératoire chez des patients ayant subi un pontage coronarien.

Par ailleurs, des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que le H₂O₂ module les propriétés électrophysiologiques des canaux potassiques HERG⁴⁰ et hKv1.5⁴¹ exprimés dans des cellules CHO. Le H₂O₂ est un important producteur de radicaux libres, diffusant facilement au-travers de membranes hydrophobes.⁴² À une concentration de 100 µM, il augmente l'amplitude du courant produit par hKv1.5 à des voltages correspondant à la phase de repolarisation du potentiel d'action (i.e. -30 à -10 mV) et il accélère l'ouverture du canal.⁴¹ Le H₂O₂ pourrait moduler le canal hKv1.5 par une oxydation des résidus cystéine (hKv1.5 en a 9, dont 5 intracellulaires et 4 dans les segments transmembranaires). Par ailleurs, il diminue l'activité adénylyl cyclase (qui transforme l'ATP en AMPc) et il atténue la transduction de signal reliée aux récepteurs β-adrénergiques.⁴³ Le H₂O₂ a de ce fait une influence sur la phosphorylation des protéines par la PKA, qui elle-même a une action régulatrice sur le canal hKv1.5.⁴⁴ Enfin, l'étude de Caouette *et al.*⁴¹ démontre clairement que hKv1.5 est sensible au stress oxydatif. Ces résultats, combinés au fait que le stress oxydatif influence le développement de la FA,³⁶ suggèrent qu'il serait possible que

les polymorphismes R87Q et P307S jouent un rôle dans le développement de la FA en présence de radicaux libres. D'ailleurs, des études épidémiologiques démontrent que des facteurs génétiques et environnementaux sont impliqués dans le développement de plusieurs pathologies et que la combinaison de ces facteurs est souvent nécessaire à l'expression de la maladie. Par exemple, la maladie thrombotique a une composante héréditaire, les patients porteurs du facteur V Leiden étant plus à risques.⁴⁵ Ce dernier est un facteur de coagulation porteur d'une mutation (G1691A dans l'ADN) et qui n'est pas correctement inactivé par la protéine C activée, une sérine protéase.⁴⁵ Les femmes prenant des contraceptifs oraux ont également un risque accru de faire des thromboses⁴⁶ et ce risque est encore plus élevé chez celles qui ont de surcroît le facteur V Leiden.⁴⁷ Par ailleurs, plusieurs cas d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux résultent de l'interaction de multiples facteurs génétiques et environnementaux (par exemple: usage du tabac, sédentarité), bien qu'aucun de ceux-ci ne puisse par lui-même causer ces maladies.⁴⁸

Jusqu'à présent, les gènes *KvLQT1*,^{49,50} *Kir2.1*⁵¹ et *MiRPI*⁵² ont été associés à quelques cas de FA familiale. Les causes potentielles de FA qui ont été identifiées par rapport à ces gènes sont des mutations augmentant l'amplitude de I_{Ks} ,^{49,50} I_{KI} ⁵¹ et d'un courant de background.⁵² Ces mutations tendraient à accélérer la repolarisation dans les oreillettes et les ventricules, ce qui signifie qu'elles pourraient potentiellement initier la FA. Ces études ont néanmoins certaines lacunes. Premièrement, dans l'étude de Chen *et al.*,⁴⁹ la mutation S140G a été identifiée dans le canal *KvLQT1* chez des membres d'une famille dont plusieurs étaient atteints de FA. Les auteurs ont proposé que cette mutation, qui augmente l'amplitude du courant I_{Ks} , pourrait mener à une diminution de la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire de l'oreillette. Cependant, plusieurs membres de la famille porteurs de cette mutation souffraient également du syndrome du QT Long⁴⁹ alors que celui-ci est plutôt associé à des mutations qui diminuent l'amplitude de I_{Ks} .⁵³ Ce paradoxe met en doute le rapport entre la mutation identifiée et le développement de la FA. Une autre faiblesse de ces études est le nombre restreint de patients qui y ont été inclus. En effet, avant de pouvoir relier une mutation à une maladie, il est essentiel de rechercher sa présence chez un très grand nombre d'individus atteints et de s'assurer qu'elle est toujours ou généralement absente chez les personnes saines. Autrement, le risque d'identifier des faux positifs est élevé.⁵⁴

Ainsi, bien que l'étude présentée au chapitre 3 ne soit pas encore concluante, elle représente une avenue fort intéressante pouvant potentiellement mener à une meilleure compréhension des bases génétiques de la FA post-opératoire. La pertinence du choix de ce modèle de FA, pour notre étude, est par ailleurs très bien démontrée par le fait que l'expression d'un grand nombre de pathologies implique des composantes génétiques (ex.: polymorphismes) et environnementales (ex.: stress oxydatif dans le cas de la FA post-opératoire). Comme la fréquence allélique des polymorphismes R87Q et P307S tend à être plus élevée chez les sujets ayant fait de la FA post-opératoire, il serait très intéressant de poursuivre l'analyse sur un plus grand nombre d'individus. Statistiquement, selon nos résultats actuels, il faudrait génotyper environ 800 patients post-pontage dont 400 auraient fait de la FA pour avoir 80% de chances d'obtenir des résultats significatifs. Ainsi, il serait peut-être possible de mieux évaluer le rôle potentiel de ces polymorphismes dans l'incidence de la FA post-opératoire et même, éventuellement, dans le développement des formes idiopathique et familiale de la maladie. L'étude pourrait aussi inclure des patients de différents groupes ethniques, ce qui la rendrait encore plus complète. Il a en effet été démontré que certains polymorphismes, dans le gène *hKv1.5* ou au niveau de la protéine, sont retrouvés plus fréquemment chez des groupes ethniques particuliers. Par exemple, Simard *et al.*¹⁰ ont séquencé le gène *hKv1.5* de 95 Caucasiens, 65 Noirs et 30 Asiatiques. Ils ont retrouvé, au niveau de l'ADN, le polymorphisme C1149T seulement parmi les Noirs, à une fréquence allélique de 6,9%. Ce dernier ne modifiait cependant pas la séquence peptidique du canal. Ils ont également retrouvé les polymorphismes A251T et P307S seulement chez les Caucasiens, tous deux à une fréquence allélique de 0,5%.¹⁰

Lien entre les polymorphismes identifiés dans le canal hKv1.5 et l'incidence de la FA familiale

Une partie de nos études portait également sur l'évaluation d'un lien possible entre les polymorphismes que nous avons identifiés et l'incidence de la FA familiale. Nous avons analysé le gène *hKv1.5* de 18 patients provenant de quatre familles, dont 10 étaient atteints de FA familiale. Cependant, nous n'avons retrouvé que le polymorphisme A251T chez deux membres de l'une des familles, soit chez une mère atteinte de FA et sa fille non

atteinte. Il est peu probable que ce polymorphisme soit une cause de la FA dans cette famille, puisqu'il ne modifie pas les propriétés électrophysiologiques du canal⁷ et qu'il a été retrouvé à la fois chez une personne atteinte et chez une personne saine.

Dans l'étude présentée au chapitre 3, nous avons également analysé le gène *hKv1.5* de certains membres des familles de patients porteurs de polymorphismes, dans le but d'évaluer si ces derniers pourraient potentiellement prédisposer à la FA familiale en plus d'avoir une incidence sur le développement de la FA post-opératoire. Dans la famille d'un patient porteur du polymorphisme A251T et ayant fait de la FA post-opératoire, nous avons retrouvé ce polymorphisme chez 3 membres sur 7. De plus, A251T a été retrouvé chez chacun des trois membres que nous avons génotypés dans la famille d'un patient porteur mais n'ayant pas fait de FA suite à son pontage. Enfin, dans une troisième famille, nous avons identifié le polymorphisme P307S chez un patient avec FA post-opératoire et chez l'un des deux membres de la famille de ce patient qui ont participé à notre étude. On note donc que le polymorphisme A251T a été retrouvé le plus fréquemment parmi les membres des familles. Ainsi, il est possible que ce dernier soit un polymorphisme commun du gène *hKv1.5*.

Il est plus probable que R87Q et P307S soient reliés à l'une ou l'autre des formes de FA étant donné leurs effets sur le canal *hKv1.5*. De plus, comme R87Q a un effet plutôt dominant contrairement à P307S et qu'il a par ailleurs été retrouvé le moins fréquemment (1 patient hétérozygote sur 135), il pourrait avoir encore plus de chances d'être relié à la FA. Cependant, nos résultats actuels nous permettent seulement d'émettre des hypothèses vu le nombre encore insuffisant de patients étudiés.

Conclusion et perspectives d'avenir reliées aux résultats de cette thèse

Les travaux présentés dans cette thèse nous permettent de mieux comprendre le fonctionnement du canal *hKv1.5* et tendent à indiquer que des polymorphismes dans ce canal pourraient potentiellement être arythmogènes. Les résultats de l'étude présentée au chapitre 3 n'ont pas permis de relier de façon significative les polymorphismes R87Q et P307S à la FA. Ceci est possiblement attribuable au nombre insuffisant de patients génotypés, puisque nous avons quand même détecté des fréquences alléliques plus élevées

parmi les patients ayant fait de la FA post-opératoire comparativement au groupe contrôle. Ainsi, nos résultats démontrent que nous sommes sur une piste intéressante qui permettra éventuellement d'établir plus clairement les bases génétiques de la FA et, par le fait même, d'améliorer les traitements actuellement utilisés contre cette maladie.

Dans l'avenir, il serait intéressant de poursuivre l'étude sur un plus grand nombre de patients afin de mieux évaluer le rôle potentiel des polymorphismes R87Q et P307S dans la pathogenèse de la FA. Il pourrait aussi être utile d'évaluer l'effet, sur les canaux variants, de radicaux libres comme le peroxy-nitrite ou de générateurs de radicaux libres tel le H_2O_2 . Pour ce faire, une bonne technique serait de produire des souris transgéniques possédant l'un ou l'autre des polymorphismes R87Q et P307S dans leur canal Kv1.5. Il s'agirait ensuite de prélever le cœur des souris, d'isoler les myocytes par dispersion enzymatique et de mesurer le courant I_{Kur} en l'absence et en présence de radicaux libres par la technique de patch-clamp. Il pourrait aussi être envisageable de faire ces expérimentations sur un modèle humain, bien que ce serait beaucoup plus délicat et hasardeux. En effet, dans un tel cas, il s'agirait de demander aux patients ayant à subir un pontage s'ils consentiraient à fournir à la fois un prélèvement sanguin et un échantillon de tissu auriculaire. Il faudrait ensuite vérifier si le patient possède le polymorphisme et, si oui, prélever les myocytes à partir de son échantillon de tissu auriculaire et faire les mesures électrophysiologiques qui s'ensuivent. S'il s'avère que les canaux variants ont moins d'inactivation et/ou s'activent plus rapidement en présence des radicaux libres, par exemple, cela pourrait signifier que les polymorphismes R87Q et P307S sont des précurseurs de la FA en combinaison avec le stress oxydatif relatif à l'âge ou à une chirurgie.

Par ailleurs, s'il est possible de relier les polymorphismes R87Q et P307S du gène *hKv1.5* à la FA dans certaines familles ou à la FA post-opératoire, l'usage de molécules dirigées plus spécifiquement contre le canal hKv1.5 pourra être très prometteur pour contrôler la FA et pour avoir une action plus ciblée vers l'oreillette. Dans les cas de FA post-opératoire, il serait très utile de doser les radicaux libres sanguins dont le peroxy-nitrite, qui est particulièrement associé à cette pathologie.³⁶ Il transforme les résidus tyrosine des protéines en 3-nitrotyrosine et il est possible de le doser indirectement par la technique de C-ELISA (competitive enzyme-linked immuno-assay) en faisant une mesure du niveau

sanguin de protéines porteuses de tels résidus nitrosylés.⁵⁵ S'il est démontré que les polymorphismes R87Q et P307S ont un potentiel accru de mener à la FA en présence d'un choc oxydatif, des niveaux sanguins élevés de peroxynitrite chez les patients porteurs, avant un pontage, pourraient alors guider les cliniciens vers la prévention ou un traitement plus approprié de la FA post-opératoire.

Plusieurs des anti-arythmiques utilisés présentement pour traiter la FA provoquent des arythmies ventriculaires, ce qui limite de manière importante les possibilités de traitement. C'est le cas, notamment, de la propafenone et de la flecainide, des anti-arythmiques de classe I.^{56,57} Étant donné que le courant I_{Kur} cardiaque n'est exprimé que dans les oreillettes, de nombreux efforts sont consacrés à trouver des agents qui inhibent le canal hKv1.5 préférentiellement aux autres canaux potassiques et qui pourraient éventuellement être utilisés comme antiarythmiques de classe III dans le traitement de la FA. Récemment, il a été démontré que l'AVE0118, le S9947, le S20951, le NIP-142, l'AZD7009 et le DPO-1 semblaient inhiber I_{Kur} de façon plus spécifique que les anti-arythmiques connus, tel que mentionné dans la section 2.5.4 de l'introduction. L'AZD7009 est d'ailleurs un médicament en essais cliniques de phase II qui semble très prometteur pour traiter la FA et qui n'a pas d'effet significatif sur l'intervalle QT.⁵⁸

Ainsi, l'AVE0118, le S9947, le S20951, le NIP-142, l'AZD7009 et le DPO-1 pourraient éventuellement être utilisés pour traiter la FA. Cependant, il est possible que ces composés n'aient pas la même efficacité chez des patients porteurs de polymorphismes dans le canal hKv1.5. Par exemple, une étude récente a démontré que les polymorphismes R578K et P532L dans hKv1.5 rendent le canal résistant à la quinidine, les IC_{50} de ces variants pour ce composé étant respectivement de 54 et 133 μ M comparativement à 8,4 μ M pour le canal sauvage. Ces deux mêmes variants sont également résistants à la propafenone.¹⁰ Il serait donc utile d'évaluer l'effet des composés mentionnés au début de ce paragraphe en présence des polymorphismes R87Q, A251T et P307S.

Du point de vue clinique, les perspectives d'avenir à plus ou moins long terme des travaux présentés dans cette thèse sont d'abord d'évaluer la proportion de patients atteints de FA qui sont porteurs des polymorphismes que nous avons identifiés. Ensuite, il serait intéressant de vérifier si ces polymorphismes ont un impact autant sur les médicaments

utilisés présentement pour traiter la FA que sur des molécules plus spécifiques à hKv1.5 (comme celles dont il est question aux deux paragraphes précédents) et qui pourraient éventuellement constituer un traitement plus adéquat de la maladie. La prochaine étape à réaliser pour faire suite à ce projet serait de tenter de relier les polymorphismes à la FA de façon significative. Dans un tel cas, cette maladie pourra être considérée avec plus de certitude comme étant une "channelopathie" au même titre que le syndrome du QT long, par exemple. Ensuite, s'il est clairement démontré qu'ils influencent la réponse à certains médicaments, les polymorphismes que nous avons identifiés pourront avoir une importance considérable en clinique. En effet, la pharmacogénomique aide les cliniciens à individualiser la thérapie en fonction du bagage génétique du patient. En cardiologie, une telle approche pourrait potentiellement aider à prévenir la FA post-opératoire. Elle pourrait aussi améliorer les traitements en diminuant les effets indésirables tels les risques pro-arythmiques et, ainsi, réduire les coûts médicaux associés à la prise en charge des patients atteints de FA.⁵⁹

Enfin, outre l'amélioration des traitements pharmacologiques, la thérapie génique pourrait éventuellement être envisagée pour contrôler la FA tout en minimisant les effets indésirables. Par exemple, Murata *et al.*⁶⁰ ont introduit, dans les cellules du nœud auriculo-ventriculaire chez le porc, un adénovirus codant pour la protéine Gem. Ils ont mis en évidence que cette protéine ralentissait la conduction au nœud auriculo-ventriculaire et réduisait la fréquence cardiaque lors de la FA. La protéine Gem fait partie de la superfamille des protéines Ras⁶¹ et elle diminue la densité du courant $I_{Ca,L}$ en inhibant le transport du canal vers la surface cellulaire.⁶² Pour ce qui est du gène *hKv1.5*, une étude a démontré que son introduction dans les poumons de rat, à l'aide d'un adénovirus, réduisait l'hypertension pulmonaire.⁶³ Cette dernière est causée par une diminution de l'expression et des fonctions des canaux potassiques Kv1.5 et Kv2.1, qui sont sensibles à l'oxygène.⁶⁴

Replaçons maintenant le gène *hKv1.5* dans le contexte de la FA et des polymorphismes que nous avons identifiés. De ceux-ci, R87Q et P307S diminuent l'amplitude de l'inactivation, tel que mentionné précédemment, et nous avons posé l'hypothèse que c'est ce qui pourrait éventuellement être arythmogène. Ainsi, à titre de perspective d'avenir plus fondamentale, il pourrait être intéressant, utilisant un modèle

animal comme le chien, d'introduire au niveau de l'oreillette des éléments génétiques susceptibles de diminuer l'expression du courant I_{Kur} , tel un ARNm anti-sens dirigé contre Kv1.5, par exemple. On pourrait alors évaluer les effets de cet ARNm anti-sens sur la phase de plateau du potentiel d'action. Ensuite, comme on soupçonne que les polymorphismes déstabilisent l'interaction du canal avec les sous-unités β , des expériences de mutagenèse dirigée pourraient être envisagées afin de produire des sous-unités β se liant de façon plus stable aux variants; ces dernières pourraient par la suite être introduites dans l'oreillette chez le modèle animal et éventuellement chez l'humain.

Autres avenues pour l'étude de la genèse de la FA

Pour terminer, voici quelques avenues supplémentaires qu'il serait intéressant d'explorer dans le but de mieux comprendre la pathogenèse de la FA. Une première avenue viserait à mieux clarifier le lien entre le syndrome métabolique et la FA. Ce syndrome réfère à une combinaison de facteurs de risques d'athérosclérose incluant la résistance à l'insuline, l'obésité, l'hypertension et la dyslipidémie.^{65,66} Plusieurs faits rapportés dans la littérature portent à croire que ce syndrome pourrait être associé à la FA, bien que le lien ne soit pas encore très bien établi. Le diabète de type 2 et l'hypertension ont récemment été associés à la FA et il semble que la résistance à l'insuline contribuerait au développement de cette arythmie.⁶⁷ Par ailleurs, une étude a démontré que l'obésité est un facteur de risque indépendant de FA post-opératoire suite à une chirurgie cardiaque.⁶⁸ Le lien entre la dyslipidémie et la FA n'est pas très bien documenté. On sait toutefois que le canal potassique Kv1.5 est influencé par certains acides gras poly-insaturés. Par exemple, les acides arachidonique et docosahexaénoïque bloquent le canal à l'état ouvert⁶⁹ et l'acide linoléique augmente son activation.⁷⁰ Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet, sur hKv1.5, d'acides gras susceptibles de faire augmenter le taux de mauvais cholestérol (i.e. le LDL-cholestérol; low density lipoprotein cholesterol) dans le sang, tels les acides laurique, myristique et palmitique. Si l'un ou plusieurs de ces acides gras augmente la vitesse d'activation et/ou diminue l'amplitude d'inactivation du canal, cela pourrait indiquer qu'un lien existe entre la FA et la dyslipidémie. Cela permettrait également de mieux définir la relation entre le syndrome métabolique et la FA.

Une autre avenue intéressante serait d'examiner la possibilité que les polymorphismes identifiés dans cette thèse affectent l'activité nerveuse aussi bien que l'activité électrique de l'oreillette. En plus d'être présent dans l'oreillette, hKv1.5 est également retrouvé dans les cellules dendritiques du système nerveux central.⁷¹ Par ailleurs, il est bien connu que le système nerveux autonome est impliqué dans l'initiation de la FA.⁷² Par exemple, la stimulation vagale libère de l'acétylcholine, qui induit la FA en diminuant la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire efficace⁷³ suite à l'activation du courant potassique repolarisateur I_{KACh} .⁷⁴ Il pourrait donc être intéressant de tester l'effet de l'acétylcholine sur hKv1.5 et sur les canaux variants caractérisés dans cette thèse afin d'évaluer leurs effets sur l'arythmogénicité du système nerveux autonome.

Enfin, à présent que la séquence d'ADN du chromosome 12 humain (qui contient le gène *hKv1.5*) est connue,⁷⁵ il serait intéressant de faire des amplifications plus étendues de la région promotrice de *hKv1.5*, afin d'y détecter la présence éventuelle de polymorphismes chez des patients atteints de FA. De tels polymorphismes pourraient avoir un lien avec le développement de cette maladie, par exemple en augmentant le taux de transcription du gène *hKv1.5*.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Kim MH, Deeb G, Morady F, Bruckman D, Hallock LR, Smith KA, Karavite DJ, Bolling SF, Pagani FD, Wahr JA, Sonnad SS, Kazanjian PE, Watts C, Williams M, Eagle KA. Effect of postoperative atrial fibrillation on length of stay after cardiac surgery (The Postoperative Atrial Fibrillation in Cardiac Surgery study (PACS²)). *Amer J Cardiol* 2001;87:881-5.
- (2) Silva RG, Lima GG, Laranjeira A, Costa AR, Pereira E, Rodrigues R. Risk factors, morbidity, and mortality associated with atrial fibrillation in the postoperative period of cardiac surgery. *Arq Bras Cardiol* 2004;83:105-10.
- (3) Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954-68.
- (4) Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;81:512-25.
- (5) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;73:1061-76.
- (6) Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001;104:569-80.
- (7) Plante I, Fournier D, Ricard G, Drolet B, O'Hara G, Champagne J, Mathieu P, Baillet R, Daleau P. Electrophysiological characterization of three non-synonymous single nucleotide polymorphisms (R87Q, A251T, and P307S) found in hKv1.5. *Pflugers Arch* 2006;452:316-23.
- (8) Mori Y, Folco E, Koren G. GH3 cell-specific expression of *Kv1.5* gene. Regulation by a silencer containing a dinucleotide repetitive element. *J Biol Chem*. 1995;270:27788-96.
- (9) Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A, Koren G. The transcription of a mammalian voltage-gated potassium channel is regulated by cAMP in a cell-specific manner. *J Biol Chem*. 1993;268:26482-93.
- (10) Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K⁺ channel gene *KCNA5*. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:138-44.
- (11) Sewing S, Roeper J, Pongs O. Kv β 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel α subunits. *Neuron* 1996;16:455-63.

- (12) Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv β 2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;271:2406-12.
- (13) Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv β 1 subunits. *J Biol Chem* 1996;271:28311-7.
- (14) Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *Am J Physiol* 1998;275:H1717-H1725.
- (15) England SK, Uebele VN, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. A novel K⁺ channel β -subunit (hKv β 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 1995;270:28531-4.
- (16) England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated K⁺ channel β subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6309-13.
- (17) Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF. Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β subunits. *Ann NY Acad Sci* 1999;868:344-55.
- (18) Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β subunits. *Nature* 1994;369:289-94.
- (19) Rich TC, Yeola SW, Tamkun MM, Snyders DJ. Mutations throughout the S6 region of the hKv1.5 channel alter the stability of the activation gate. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C161-C171.
- (20) Rich TC, Snyders DJ. Evidence for multiple open and inactivated states of the hKv1.5 delayed rectifier. *Biophys J* 1998;75:183-95.
- (21) Fink M, Duprat F, Lesage F *et al.* A new K⁺ channel β subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem* 1996;271:26341-8.
- (22) Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kv β subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem* 2001;276:4839-44.
- (23) Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE, Trimmer JS. β subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* 1996;16:843-52.

- (24) Kosolapov A, Deutsch C. Folding of the voltage-gated K⁺ channel T1 recognition domain. *J Biol Chem* 2003;278:4305-13.
- (25) Lu J, Robinson JM, Edwards D, Deutsch C. T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry* 2001;40:10934-46.
- (26) Robinson JM, Deutsch C. Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron* 2005;45:223-32.
- (27) Kurata HT, Soon GS, Eldstrom JR, Lu GW, Steele DF, Fedida D. Amino-terminal determinants of U-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* 2002;277:29045-53.
- (28) Choi WS, Khurana A, Mathur R, Viswanathan V, Steele DF, Fedida D. Kv1.5 surface expression is modulated by retrograde trafficking of newly endocytosed channels by the dynein motor. *Circ Res* 2005;97:363-71.
- (29) Valetti C, Wetzel DM, Schrader M *et al.* Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* 1999;10:4107-20.
- (30) Holmes TC, Fadool DA, Ren R, Levitan IB. Association of *Src* tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* 1996;274:2089-91.
- (31) Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 2000;14:231-41.
- (32) Li M, Jan YN, Jan LY. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 1992;257:1225-30.
- (33) Babila T, Moscucci A, Wang H, Weaver FE, Koren G. Assembly of mammalian voltage-gated potassium channels: evidence for an important role of the first transmembrane segment. *Neuron* 1994;12:615-26.
- (34) Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccino FP, Sagnella GA, Kass RS, Keating MT. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* 2002;297:1333-6.
- (35) Pietila E, Fodstad H, Niskasaari E, Laitinen PPJ, Swan H, Savolainen M, Kesaniemi YA, Kontula K, Huikuri HV. Association between HERG K897T polymorphism and QT interval in middle-aged Finnish women. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:511-4.

- (36) Mihm MJ, Yu F, Carnes CA *et al.* Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001;104:174-80.
- (37) Mihm MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA. Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 2001;49:798-807.
- (38) Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J* 2000;14:271-8.
- (39) Carnes CA, Chung MK, Nakayama T *et al.* Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res* 2001;89:E32-E38.
- (40) Bérubé J, Caouette D, Daleau P. Hydrogen peroxide modifies the kinetics of HERG channel expressed in a mammalian cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:96-102.
- (41) Caouette D, Dongmo C, Berube J, Fournier D, Daleau P. Hydrogen peroxide modulates the Kv1.5 channel expressed in a mammalian cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:479-86.
- (42) Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.
- (43) Persad S, Rupp H, Jindal R, Arneja J, Dhalla NS. Modification of cardiac β -adrenoceptor mechanisms by H₂O₂. *Am J Physiol* 1998;274:H416-H423.
- (44) Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996;78:903-15.
- (45) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
- (46) Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *BMJ* 2001;323:131-4.
- (47) Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994;344:1453-7.
- (48) van Asselt KM, Kok HS, van der Schouw YT, Peeters PHM, Pearson PL, Grobbee DE. Role of genetic analyses in cardiology: part II: heritability estimation for gene searching in multifactorial diseases. *Circulation* 2006;113:1136-9.

- (49) Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S *et al.* KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003;299:251-4.
- (50) Hong K, Piper DR, az-Valdecantos A *et al.* De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res* 2005;68:433-40.
- (51) Xia M, Jin Q, Bendahhou S *et al.* A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:1012-9.
- (52) Yang Y, Xia M, Jin Q *et al.* Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;75:899-905.
- (53) Wang Q, Curran ME, Splawski I *et al.* Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996;12:17-23.
- (54) Priori SG, Napolitano C. Role of genetic analyses in cardiology: part I: mendelian diseases: cardiac channelopathies. *Circulation* 2006;113:1130-5.
- (55) Khan J, Brennan DM, Bradley N, Gao B, Bruckdorfer R, Jacobs M. 3-nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J.* 1998;330:795-801.
- (56) Campbell TJ. Subclassification of class I antiarrhythmic drugs: enhanced relevance after CAST. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992;6:519-28.
- (57) Greene HL, Roden DM, Katz RJ, Woosley RL, Salerno DM, Henthorn RW. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial: first CAST ... then CAST-II. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:894-8.
- (58) Goldstein RN, Khrestian C, Carlsson L, Waldo AL. Azd7009: a new antiarrhythmic drug with predominant effects on the atria effectively terminates and prevents reinduction of atrial fibrillation and flutter in the sterile pericarditis model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15:1444-50.
- (59) Johnson JA, Cavallari LH. Cardiovascular pharmacogenomics. *Exp Physiol* 2005; 90:283-9.
- (60) Murata M, Cingolani E, McDonald AD, Donahue JK, Marbán E. Creation of a genetic calcium channel blocker by targeted gem gene transfer in the heart. *Circ Res* 2004;95:398-405.
- (61) Maguire J, Santoro T, Jensen P, Siebenlist U, Yewdell J, Kelly K. Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. *Science* 1994;265:241-4.

- (62) Beguin P, Nagashima K, Gono T, Shibasaki T, Takahashi K, Kashima Y, Ozaki N, Geering K, Iwanaga T, Seino S. Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature* 2001;411:701-6.
- (63) Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, Thébaud B, Wu XC, Dyck JR, Hashimoto K, Wang S, Moudgil R, Harry G, Sultanian R, Koshal A, Archer SL. *In vivo* gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation* 2003;107:2037-44.
- (64) Reeve HL, Michelakis E, Nelson DP, Weir EK, Archer SL. Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 2001;90:2249-56.
- (65) Scott CL. Diagnosis, prevention, and intervention for the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 2003;92:35i-42i.
- (66) Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J*. 2005;149:33-45.
- (67) Ostgren CJ, Merlo J, Rastam L, Lindbland U. Atrial fibrillation and its association with type 2 diabetes and hypertension in a Swedish community. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6:367-74.
- (68) Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah AS, Habib RH. Obesity and risk of new-onset atrial fibrillation after cardiac surgery. *Circulation*. 2005;112:3247-55.
- (69) Honoré E, Barhanin B, Attali F, Lesage J, Lazdunski M. External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1937-44.
- (70) McKay MC, Worley JF. Linoleic acid both enhances activation and blocks Kv1.5 and Kv2.1 channels by two separate mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1277-C1284.
- (71) Mullen KM, Rozycka M, Rus H, Hu L, Cudrici C, Zafranskaia E, Pennington MW, Johns DC, Judge SI, Calabresi PA. Potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 are expressed on blood-derived dendritic cells in the central nervous system. *Ann Neurol*. 2006;60:118-27.
- (72) Olshansky B. Interrelationships between the autonomic nervous system and atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005;48:57-78.
- (73) Spach MS, Heidlage JF, Dolber PC, Barr RC. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circ Res*. 2000;86:302-11.

- (74) Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K⁺ current (I_{KAch}) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I_{KAch} and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation*. 2001;104:2551-7.
- (75) Scherer SE, Muzny DM, Buhay CJ *et al*. The finished DNA sequence of human chromosome 12. *Nature*. 2006;440:346-51.

ANNEXE

**REDUCED VULNERABILITY TO VAGALLY-INDUCED ATRIAL
FIBRILLATION BY N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN
DOGS**

**Reduced Vulnerability to Vagally-Induced Atrial Fibrillation by n-3 Polyunsaturated
Fatty Acids in Dogs**

First Author: Jean-Francois Sarrazin¹, MD

Other Authors: Genevieve Comeau¹, MSc; Pascal Daleau^{1,2}, PhD; John Kingma^{1,3},
PhD; Isabelle Plante¹, MSc; Dominique Fournier¹, MSc; Franck
Molin^{1,3}, MD

Addresses:

1. Institut universitaire de Cardiologie et Pneumologie
Laval Hospital
2725, chemin Sainte-Foy,
Sainte-Foy (Quebec), Canada, G1V 4G5
2. Faculty of Pharmacy, Laval University
Cite universitaire, Sainte-Foy (Quebec), Canada, G1K 7P4
3. Faculty of Medicine, Laval University
Cite universitaire, Sainte-Foy (Quebec), Canada, G1K 7P4

Correspondence: Franck Molin, MD
Institut universitaire de Cardiologie et Pneumologie, Laval Hospital
2725, chemin Sainte Foy
Sainte-Foy (Quebec), Canada, G1V 4G5
Telephone: (418) 656-4598
Fax: (418) 656-4574
Email: franck.molin@med.ulaval.ca

Total word count: 5225

Soumis au *Journal of American College of Cardiology*

RÉSUMÉ

Objectifs: Les objectifs de cette étude étaient de déterminer si les acides gras n-3 poly-insaturés (n-3 PUFAs) préviennent la fibrillation auriculaire (FA) induite par stimulation vagale chez un modèle canin et d'évaluer leur impact sur les niveaux d'expression des connexines (Cx) 40 et 43 dans les tissus auriculaires.

Contexte: Il a été démontré que les n-3 PUFAs ont des propriétés cardioprotectrices ayant pour rôles d'offrir une protection contre les arythmies ventriculaires et de réduire l'incidence de la FA postopératoire.

Méthodes: Vingt-cinq chiens ont été soumis au modèle de FA induite par stimulation vagale. Les techniques d'extra stimulus et de stimulation rapide de l'oreillette ont été utilisées pour induire la FA. Huit des 25 chiens ont été traités avec des n-3 PUFAs (1,2 g par jour, pris oralement) pendant 14 jours. Dix-sept chiens additionnels ont été inclus dans l'étude; la FA a été induite chez 8 de ceux-ci, auxquels on a par la suite administré une dose intraveineuse de n-3 PUFAs (1.4 g d'huile de poisson dissoute dans une solution composée de 10 g d'albumine humaine à 30% dans de la saline) avant de ré-induire la FA. Le nombre d'épisodes de FA induite a été comparé dans chacun des groupes. Les niveaux d'expression des Cx 40 et 43 ont été mesurés, dans les tissus auriculaires, à l'aide de la technique d'immunobuvardage Western.

Résultats: Suivant le traitement avec les n-3 PUFAs, les niveaux plasmatique et auriculaire de ces derniers étaient augmentés de façon significative. Aucun changement n'a été observé dans les paramètres hémodynamiques et électrocardiographiques. Les périodes réfractaires de l'oreillette n'étaient pas affectées par l'administration orale de n-3 PUFAs. Suite à la prise orale de ces acides gras, le nombre d'épisodes de FA soutenue a chuté de 79% (10,5 versus 48%, $p=0,001$) et de 42% (22,5 versus 38,8%, $p=0,034$) lorsque la FA était induite par les techniques respectives d'extra stimulus et de stimulation rapide de l'oreillette. L'administration par voie orale des n-3 PUFAs a réduit les niveaux d'expression des Cx 40 et 43 (diminution de 60% ($p=0,019$) et 42% ($p=0,038$), respectivement). Chez les chiens ayant reçu les n-3 PUFAs par voie intraveineuse, la FA induite par la technique d'extra stimulus était réduite de 61,9% ($p=0,0001$).

Conclusions: Le traitement avec des huiles de poisson administrées par voie orale a augmenté les niveaux plasmatique et auriculaire de n-3 PUFAs tout en réduisant la vulnérabilité à l'induction de la FA chez ce modèle canin. La modulation des niveaux d'expression des Cx cardiaques contribue probablement aux effets anti-arythmiques des huiles de poisson.

Mots-clés: fibrillation auriculaire, connexine, acides gras, nerf vague.

ABSTRACT

Objectives: The aims of this open-label, uncontrolled study were to determine whether n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3PUFAs) prevent atrial fibrillation (AF) induced by vagal stimulation in a canine model and to evaluate their impact on expression levels of connexins (Cx) 40 and Cx43 in atrial tissues.

Background: N-3PUFAs have demonstrated cardioprotective properties by protecting against ventricular arrhythmias and reducing postoperative AF.

Methods: Twenty-five dogs were studied using the vagally-induced AF model. Eight dogs were treated with n-3PUFAs (1.2g PO daily) for 14 days. Seventeen additional dogs were studied; of these dogs, 8 with inducible AF were restudied following intravenous treatment with n-3PUFAs. Episodes of inducible AF were compared. Cx40 and Cx43 levels in atrial biopsies were evaluated.

Results: Plasma and atrial n-3PUFAs levels were significantly increased following treatment. No changes were observed regarding hemodynamic or electrocardiographic parameters. Atrial refractory periods were not affected by oral treatment. The number of episodes of sustained AF following oral treatment was reduced by 79% with the extrastimulus technique (10.5 vs. 48.9%, $p=0.001$) and by 42% with burst induction (22.5 vs. 38.8%, $p=0.034$). Cx40 and Cx43 levels were lower following oral treatment (decrease of 60% ($p=0.019$) and 42% ($p=0.038$), respectively). In dogs that were given n-3PUFAs intravenously, AF inducibility by the extra stimulus technique was reduced by 61.9% ($p=0.0001$).

Conclusions: Oral treatment with fish oils increased plasma and atrial n-3PUFAs levels and reduced vulnerability to induction of AF in this dog model. Modulation of cardiac Cx probably contributes to the antiarrhythmic effects of fish oils.

Key words: atrial fibrillation, connexin, fatty acids, vagus nerve

CONDENSED ABSTRACT**Omega-3 Reduce Atrial Fibrillation and Connexins**

This study evaluated whether n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) prevent atrial fibrillation (AF) induced by vagal stimulation and their impact on atrial expression of connexins (Cx). Eight dogs were given oral n-3 PUFAs for 14 days. Seventeen control dogs were studied; of these dogs, 8 with inducible AF were restudied following intravenous treatment with n-3 PUFAs. Episodes of inducible AF were compared. Cx40 and Cx43 protein levels were also evaluated. Sustained AF in the oral group was reduced by 79% with the extra stimulus technique ($p=0.001$) and by 42% with burst induction ($p=0.034$). Cx40 and Cx43 protein levels were 60% and 42% lower in dogs with oral treatment. Protection against AF could be related to modulation of Cx expression levels by n-3 PUFAs.

LIST OF ABBREVIATIONS

AF = atrial fibrillation

BCL = basic cycle lengths

BP = blood pressure

Cx = connexins

DHA = docosahexaenoic acid

EPA = eicosapentaenoic acid

ERP = effective refractory period

HR = heart rate

LV = left ventricular

LVEDP = left ventricular end-diastolic pressure

NS = not significant

PAC = premature atrial complex

N-3 PUFAs = n-3 polyunsaturated fatty acids

SD = standard deviation

INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF) is a common arrhythmia encountered in clinical practice. Pharmacotherapy used to restore or maintain normal sinus rhythm is currently suboptimal being successful in 50-70% of patients; many of these drugs induce important side effects that are associated with a risk of ventricular pro-arrhythmias (1).

Dietary fish oils are a major source of omega-3 or n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs); dietary fish oil supplementation has been suggested to lower mortality by reducing sudden cardiac death and in all likelihood ventricular tachyarrhythmias (2-5). Experimental evidence supports the favorable antiarrhythmic effects of n-3 PUFAs (6). Few studies have focused on the effect of fish oils on atrial arrhythmias. Although increased consumption of fish in patients has been shown to both lower risk of (7), and have no effect on AF (8), recent studies showed that n-3 PUFAs reduce the incidence of postoperative AF (9) and decrease the burden of AF in patient with pacemaker (10).

The mechanisms responsible for the cardioprotective actions of n-3 PUFAs are not clear but may be related to action on various ions channels (6), to changes in calcium handling (11), to enhanced membrane fluidity (12), and to reduced stretch-induced AF (13). Other mechanisms have been proposed including lower blood pressure (BP) at high doses (14), anti-inflammatory properties (15), improvement of left ventricular (LV) diastolic function (16), and increased production of nitric oxide (17,18).

AF is associated with altered electrophysiological properties, mainly reduced atrial effective refractory period (ERP) and slow conduction velocity. The latter depends on cell to cell communications that are determined by gap junction channels (19). In cardiac tissues connexins (Cx) 40, 43 and 45 have been detected, with Cx40 and Cx43 being the principal components of atrial gap junctions. Changes in spatial organization of gap junctions or cellular levels of cardiac Cx are associated with arrhythmogenesis (20-24); however, the role of Cx in AF remains controversial. Whether n-3 PUFAs influence atrial Cx content has not been investigated.

The present study was designed to demonstrate that the level of atrial n-3 PUFAs could be enhanced with dietary fish oil supplementation and that this could reduce the incidence of vagally-induced AF in dogs. We also examined whether treatment with n-3 PUFAs would influence expression of atrial Cx40 and Cx43 levels that could be associated with a reduction in the incidence of AF.

METHODS

Animal Preparation. Experimental procedures reported here conformed to guidelines of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care (volumes 1 and 2) and were approved by the Laval University Animal Care Committee. Dogs were fed normal chow containing a minimal level of fish products (0.1%) and given access to water *ad libitum*. Twenty-five adult mongrel dogs (16 males, 9 females; 18-30 Kg) were premedicated with fentanyl (0.02 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ SC) and midazolam (0.1 mg/Kg IM) and anesthetized with thiopental (20 mg/Kg IV). Fentanyl (5-7.5 mg/Kg/min IV) was continuously infused during the experiment; anesthesia was maintained using isoflurane (1.5-3.5%). An endotracheal tube was inserted; dogs were ventilated with a positive-pressure respirator (Ohmeda 7800 ventilator, DRE Medical Incorporated, Louisville, KY, USA) with settings adjusted to maintain blood gases within the physiological range. Body temperature was maintained at 38°C.

An 8 Fr sheath was inserted into the right femoral artery and a pig-tail catheter advanced into the left ventricle to measure end-diastolic pressure; the catheter was subsequently pulled back into the aortic root to measure arterial pressures. An 8 Fr sheath was placed in the right femoral vein and a decapolar catheter (Cordis, DCDA 15S4C4-00.5, Miami Lakes, FL, USA) was wedged in the upper right atrium under fluoroscopy; this catheter was used for atrial pacing and recording of bipolar atrial electrograms. Heparin (150 U/Kg IV bolus) was given after insertion of all catheters; half dose boluses were repeated hourly during the experiment. Surface electrocardiogram, aortic BP and intra-atrial electrical activity were continuously recorded using AxoScope data acquisition software (Axon Instruments, Union City, CA, USA). At the end of the experiment dogs were given an overdose of thiopental and sacrificed using euthanyl (107 mg/kg IV).

Vagal Stimulation and Measurement of Electrophysiological Parameters. For these studies vagally-induced AF was initiated in closed-chest dogs as previously described (25,26). After a mid-line cervical incision, the left and right vagal nerves were carefully dissected, isolated and then ligated cranially. Two Teflon-coated stainless steel electrodes with non-coated distal ends were inserted through an 18-gauge needle into each vagal nerve; electrodes were connected to a Grass stimulator (model S48, Astro-Med Inc, W. Warwick, RI, USA) for bilateral efferent vagal nerve stimulation. Vagal stimulation (pulse width of 0.1 ms) was initiated at amplitude of 5 V and frequency of 10 Hz. Amplitude and/or frequency were titrated to lower HR to 50% of basal HR immediately before vagal stimulation (25,27,28).

The decapolar catheter was connected to a second stimulator (Ventritex HVS, Model HV0200, Sunnyvale, CA, USA) and pacing and sensing threshold were determined; pacing was performed at four times threshold. Atrial effective refractory period (ERP, longest coupling interval between the basic drive and the premature impulse that fails to result in atrial depolarization) was measured using the S₁-S₂ extra stimulus technique at basic cycle lengths (BCL) of 400, 300, 250 and 200 ms (26,29,30). The mean of 3 ERP values at each BCL was used in the data analysis.

Atrial Fibrillation Model. Right atrial stimulation combined with vagal stimulation was used to produce sustained AF (25-28,30). Two techniques were used to induce AF: extra stimulus (29) and burst pacing (26,27). For the extra stimulus technique, a short train of 8 beats at 400 ms (S_1) was followed by one (S_2), then two (S_3) and finally three (S_4) consecutive premature atrial complexes (PACs) as shown in Figure 1. PACs were introduced at 10 ms above the ERP and then slowly decreased until AF was induced or the signal failed to capture. Three attempts were made for each PAC (S_2 , S_3 and S_4); a total of nine attempts to induce AF were made in each dog. For the burst pacing technique, 30 consecutive beats were provoked at a cycle length of 100 ms; five attempts to induce AF were made in each dog. Data were recorded independently as either: i) no AF, ii) non-sustained AF (episodes lasting longer than 1 sec but less than 1 min (30,31) or iii) sustained AF (episodes lasting longer than 1 min). After positive determination of sustained AF, vagal stimulation was stopped. If AF persisted longer than 5 minutes once vagal stimulation was stopped, normal sinus rhythm was restored by direct current electrical cardioversion. Frequency of AF was calculated as the quotient of the number of successful sustained AF inductions and the total number of attempts for each technique.

Experimental Design. Dogs were assigned but not randomized to either control or oral treatment groups. Eight dogs were given 1.2 g daily of n-3 PUFAs for 14 consecutive days (containing 320 mg EPA and 160 mg DHA per gram, MEG-3 TM brand omega-3 fish oil, Ocean Nutrition Canada Ltd., Dartmouth, NS, Canada). Control dogs were given a standard diet. Of the seventeen control dogs AF was induced in eight; these dogs were reassessed after intravenous administration of n-3 PUFAs (1.4 g fish oil suspended in carrier solution comprising 10 g of 30% human albumin (SIGMA Chemical Co., St-Louis, MO, USA) and warmed saline); this mixture was shaken in a 60 mL syringe to yield an opalescent and stable suspension that was infused at 1 ml/min IV. The intravenous n-3 PUFAs treatment group served as its own control since experiments were performed before and after infusion of n-3 PUFAs.

Baseline hemodynamic parameters including left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and ERP were recorded in the absence of vagal stimulation after a 5 min stabilization period. A blood sample was drawn for determination of total plasma n-3 PUFAs, DHA and EPA levels (samples analyzed using HPLC at the Human Nutraceutical Research Unit, University of Guelph, ON, Canada). Hemodynamic parameters and ERP were assessed during vagal stimulation. At the end of the experiment but prior to sacrifice, a large right atrial biopsy was removed for *ex vivo* electrophysiological measurements and determination of tissue n-3 PUFAs and Cx40 and Cx43 levels.

Protein Isolation and Western Blotting for Cx40 and Cx43. Expression levels of Cx40 and Cx43 proteins were measured by western blotting in atrial biopsies from eight control dogs and seven dogs treated orally with n-3 PUFAs using a modified technique from our laboratory (32); expression levels of phosphorylated forms of Cx40 and Cx43 were also assessed.

Atrial tissue samples were homogenized on ice in buffer as previously described (32). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C. Total protein content was determined using the Bio-Rad Protein Assay (Mississauga, Canada) with bovine albumin as

standard and subsequently separated with an 8% denaturing-PAGE. Proteins transferred to Immobilon PVDF membranes (Millipore Corp, Mississauga, Canada) were incubated (1 hr at room temperature) with rabbit polyclonal antibodies for Cx40 and Cx43 (epitopes CxA-5 and CxA-1 respectively; Chemicon International, Temecula, CA, U.S.A.). Antibodies were diluted in TBS-Tween 1:200 for anti-Cx40 and anti-Cx43. After four 5-min washes in TBS-T, membranes were incubated with a secondary antibody (anti-rabbit, Cedarlane, Hornby, ON, Canada), conjugated with horseradish peroxidase. An enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada) was used to reveal the antigen-antibody complex on Biomax MS Kodak films (Chalon-sur-Saône, France). Images were analysed using a scanning densitometer (ChemiGenius XE, Canberra Packard, Montreal, QC, Canada). The average densitometric value from control dogs (n = 8) was taken as 100%.

Assessment of Atrial Omega-3 and Omega-6 Levels. Total lipid extracts were prepared from atrial biopsies by the extraction method of Bligh and Dyer (33) using chloroform:methanol (1:2 by volume); lipids were separated by thin-layer chromatography. The fatty acid methyl esters were prepared from the phospholipid fraction as previously described by Morrison and Smith (34) and were analyzed on a Varian 3800 gas-liquid chromatograph (Palo Alto, CA, USA) with a 60-m DB-23 capillary column (0.32 mm internal diameter).

Statistical Analysis. Hemodynamic parameters, electrocardiographic measurements and ERP are reported as mean \pm standard deviation (SD). Densitometry values are expressed as mean \pm SEM. A p value <0.05 was considered statistically significant. Between group comparisons were performed using an unpaired Student's t-test for the n-3 PUFAs oral treatment group and a paired Student's t-test for the intravenous treatment group; two-tailed tests were used for individual statistical comparisons. The frequency of AF was compared using chi square analysis.

RESULTS

Baseline Characteristics. Twenty-five dogs were entered into the study. Total n-3 PUFAs plasma levels increased significantly from $2.10 \pm 0.37\%$ in controls to $9.17 \pm 0.72\%$ ($p < 0.001$) in the oral treatment group; proportional increases in EPA (0.49% versus 3.01%) and DHA (0.41% versus 3.19%) were also observed (Figure 2). There was no change in plasma levels of n-3 PUFAs in the IV treatment group: EPA 0.50%, DHA 0.43% and total n-3 PUFAs 2.13%. Total n-3 PUFAs atrial tissue levels were increased significantly in the oral treatment group ($5.78 \pm 0.71\%$ versus $2.48 \pm 0.42\%$ in controls, $p < 0.001$). In addition, omega-6 levels decreased from $47.69 \pm 2.58\%$ in controls to $44.55 \pm 1.58\%$ ($p = 0.002$) in the oral treatment group.

Electrophysiologic Parameters. Pacing thresholds and sensing were similar for all experimental groups. During vagal stimulation, HR was reduced by 46.2% in oral treatment dogs and 45.3% in controls ($p = \text{NS}$). Average vagal stimulation required to achieve these levels was 11.4 Hz at 6.1 V in the oral treatment group and 12.9 Hz at 6.1 V in controls ($p = \text{NS}$).

Significant differences were not observed between control and oral treatment groups for hemodynamic or electrocardiographic variables either at baseline or during vagal stimulation (Table 1). Vagal stimulation decreased BP, prolonged the PR interval and shortened the QT interval ($p < 0.020$ for each parameter) in both groups. However, in the IV treatment group BP was significantly lower, PR interval was shorter and QT interval was longer at baseline; QRS was also larger during vagal stimulation in these dogs. The latter changes may be due to acute administration of fish oil emulsion.

Vagal stimulation significantly shortens atrial ERPs compared to baseline in all groups ($p < 0.002$), but ERPs were similar when comparison was made between each treatment group (Table 2).

AF Induction. Induction of AF was initially done using the extra stimulus technique. Incidence of sustained AF after 1 PAC was 26.0% in controls (13/50 attempts), 24.0% in IV treatment dogs (6/25 attempts, $p = \text{NS}$) and 4.2% in n-3 PUFAs oral treatment dogs (1/24 attempts, $p = 0.015$) (Figure 3A). After 2 PACs, sustained AF was induced in 38.0% of controls (19/50 attempts), 21.1% of IV treatment dogs (4/19 attempts, $p = 0.002$) and 12.5% of oral treatment dogs (3/24 attempts, $p = 0.010$) (Figure 3B). After 3 PACs, the incidence of sustained AF was 48.9% in controls (23/47 attempts), 28.6% in IV treatment dogs (6/21 attempts, $p < 0.001$) and 10.5% in oral treatment dogs (2/19 attempts, $p = 0.001$) (Figure 3C); these data show a 79% reduction in the incidence of sustained AF following oral treatment with n-3 PUFAs. Combined data for the extra stimulus technique demonstrated a significantly lower incidence of sustained AF in oral treatment dogs (37.4% in controls versus 8.9% with oral n-3 PUFAs, $p < 0.001$). Using the burst pacing technique, sustained AF occurred in 38.8% of controls (26/67 attempts), 42.1% of IV treatment dogs (16/38 attempts, $p = \text{NS}$) and 22.5% of oral treatment dogs (9/40 attempts) ($p = 0.034$) (Figure 4).

Overall, 27 episodes of non-sustained AF with an average duration of 26 seconds was induced in controls; 23 episodes of non-sustained AF with an average duration of 21 seconds were induced in oral treatment dogs ($p=NS$ for episodes and duration); 5 episodes of non-sustained AF with an average duration of 11 seconds was induced in IV treatment dogs ($p=NS$).

One dog from the control group developed repetitive ventricular tachycardia that could not be controlled with xylocaine 40 mg IV and was excluded from the analysis of AF induction.

Western Blotting. Total atrial Cx40 and Cx43 levels are shown in Figure 5; in n-3 PUFAs oral treatment dogs Cx40 and Cx43 protein levels were 60% ($p=0.019$) and 42% ($p=0.038$) respectively lower than in controls. In oral treatment dogs, expression levels of the phosphorylated form of Cx40 (P1) decreased by 63% ($p=0.024$) while the two phosphoisoforms of Cx43 (P2 and P1) decreased by 49% ($p=0.047$) and 33% ($p=0.153$) respectively. Non-phosphorylated forms of Cx40 and Cx43 (P0) decreased by 55% ($p=0.020$) and 43% ($p=0.024$), respectively.

DISCUSSION

Results of the present study demonstrate that oral treatment with n-3 PUFAs significantly increases atrial tissue levels of n-3 PUFAs and lowers AF inducibility in this canine model. In addition, we report that oral treatment with n-3 PUFAs markedly decreases expression levels of both Cx40 and Cx43 in atrial tissues.

Tissue levels of n-3 PUFAs. Our findings support recent data regarding the antiarrhythmic properties of n-3 PUFAs (7,9). Blood and atrial tissue n-3 PUFAs levels were significantly augmented in dogs given fish oil over a period of 14 days. The correlation between blood and cardiac fatty acid composition in man requires further investigation; however, recent clinical (35) and experimental (13) studies indicate that red cell EPA + DHA levels may be the preferred surrogate for cardiac omega-3 status. The dose of n-3 PUFAs (1.2 g daily of EPA + DHA) added to the diet in the present study was comparable to those recommended by the American Heart Association (36), and was sufficient to reach established therapeutic levels. In a study of 94 men in whom sudden cardiac death occurred as the first manifestation of cardiovascular disease and that were matched with control subjects, the relative risk of sudden death was significantly lower when baseline blood levels of long-chain n-3 fatty acids were in the higher quartile (6.08-10.2%) (37).

Electrophysiologic Properties. Atrial refractoriness was not affected in fish oil fed dogs compared to controls. These data are not consistent with recent experimental findings in isolated rabbit hearts subjected to rapid burst pacing and increasing intra-atrial pressures (13); differences may be due in part to different experimental models and potential variations of action potential characteristics in higher mammalian species. The electrophysiologic findings of the present study concord with recent reports documenting reduced incidence of AF following n-3 PUFAs treatment (7,9,10). The mechanisms by which n-3 PUFAs exert antiarrhythmic effects remains unclear but were not related to changes in cardiac hemodynamics or atrial ERP. N-3 PUFAs may prevent ventricular arrhythmias by inhibiting fast, voltage-dependent sodium channels and L-type calcium channels (13,38); however, QRS and QTc durations were not affected in oral treatment dogs in this study indicating that these channels were not significantly altered *in situ*. Previous animal and human studies using standard doses of n-3 PUFAs were also unable to detect a difference on electrocardiographic parameters (3,39). Modulation of conduction velocity or conduction heterogeneity was not addressed in the present study and therefore cannot be ruled out as contributory mechanisms to the protection observed in fish oil fed dogs.

Cardiac Connexins and n-3 PUFAs. Several studies have documented an association between AF and an increase in Cx expression (20,40,41); in some studies this was also associated with a remodelling of gap junction distribution. Chronic atrial pacing increases expression of Cx43 in the canine (40) and is also associated with depressed atrial conduction. This apparent paradox may be reconciled by altered distribution patterns of gap junctions (i.e. changed anisotropy) that could contribute to development of multiple wavelet reentry. An elevated Cx40 expression level has been associated to an increase in AF susceptibility in a population of patients undergoing cardiac surgery (21). However, other investigators report either no change or decreased Cx40 and Cx43 expression levels

in a goat model of AF (42). In heterozygous Cx43^{+/-} knock-out mice, no difference in atrial conduction was observed compared to wild type (43); when these mice were subjected to myocardial infarction, the frequency of spontaneous or inducible arrhythmias compared to wild type was not increased, suggesting that a reduction in Cx43 expression was not related to arrhythmogenicity (44).

In the present study, lower cardiac Cx40 and Cx43 levels following oral n-3 PUFAs treatment were associated with an increased AF triggering threshold; these data confirm that n-3 PUFAs protect against arrhythmias but also document that this protection may involve n-3 PUFAs-mediated effects at the level of cardiac Cx. In a post-hoc analysis, atrial connexin levels were compared for animals with and without inducible AF; protection against AF following n-3 PUFA oral treatment appeared to be related to lower atrial Cx40 expression levels ($p < 0.001$; no change between experimental groups for all phosphorylated forms of Cx43).

Phosphorylation of Cx43 is involved in synthesis, assembly (45), and regulation of gap junction conductance/permeability (46). Cx phosphorylation is also associated with either increased or decreased gap junction intercellular communications (47,48); poor correlation between cell-to-cell communication and changes in phosphorylation status of Cx43 have been reported (49). We did not observe major changes in the ratio of phosphorylated and non-phosphorylated forms of Cx40 and Cx43 in association with the lower Cx40 and Cx43 expression levels; further experiments are necessary to elucidate mechanisms involved in n-3 PUFAs-induced downregulation of these two cardiac Cx. It should be kept in mind that western blotting or immunohistochemistry only identify the presence of a protein without providing insights into its functional state: the amount of gap junction protein expression is not necessarily associated with the level of intercellular conductance and only a limited proportion of these gap junctions are necessary for optimal cell-to-cell electrical propagation (50).

Potential limitations. Since AF is a progressive and slowly evolving condition in humans, data from short-term studies, including the present study, should be interpreted with caution. While vagal stimulation facilitates induction of prolonged AF (25-29,31) the latter could only be induced in 50% of control dogs. Further limitations include: 1) autonomic tone influences AF (51) but vagally-mediated paroxysmal AF is not common in humans (52), 2) AF usually occurs in diseased atria, and 3) AF induced by vagal stimulation in dogs is probably quite different from that observed in humans. The major limitation of the present study is the absence of a control vehicle treatment group for direct comparison with the 14-day n-3 PUFAs oral treatment group; the lack of randomization and blinding should also be considered.

Results for the IV treatment group are difficult to interpret; indeed, the lack of change in plasma n-3 PUFAs levels could be the consequences of the rapid blood clearance of n-3 PUFAs (i.e. less than 10-15% by 5 min, dropping to 1-2% by 25 min) (53). The lower incidence of AF observed in these dogs during either 2 or 3 PACs might be explained by indirect actions of n-3 PUFAs despite normal plasma levels or by unknown effects of albumin.

Conclusion. Oral treatment with fish oils markedly increased n-3 PUFAs in plasma and atrial tissues and reduced vulnerability to induction of AF in this canine model of vagally-induced AF. Modulation of cardiac Cx probably contributes to the antiarrhythmic effects of fish oil supplementation. These findings add further insight to mechanisms involved in atrial arrhythmogenic remodeling and support the rationale for continued clinical studies to examine cardioprotective effects of dietary fish oil supplementation in man.

ACKNOWLEDGMENTS

The assistance of support staff including Guy Noel, Justin Robillard, Sebastien Poulin, Lynn Atton and Lyne Dufort is gratefully acknowledged. This study was funded by the Quebec Heart Institute Foundation. Biochemical evaluations of plasma PUFAs, EPA and DHA were carried out at the Human Nutraceutical Research Unit at the University of Guelph, ON. We thank Ocean Nutrition Canada Ltd for providing the fish oil used in this study.

REFERENCES

1. Naccarelli GV, Wolbrette DL, Bhatta L, et al. A review of clinical trials assessing the efficacy and safety of newer antiarrhythmic drugs in atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol* 2003;9:215-22.
2. Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C. The inverse relationship between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;312:1205-9.
3. Billman GE, Kang JX, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure ω -3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 1999;99:2452-7.
4. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989;2(8666):757-61.
5. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999;354:447-55.
6. De Caterina R, Madonna R, Zucchi R, La Rovere MT. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids: from epidemiology to bedside. *Am Heart J* 2003;146:420-30.
7. Mozaffarian D, Psaty BM, Rimm EB, et al. Fish intake and risk of incident atrial fibrillation. *Circulation* 2004;110:368-73.
8. Frost L, Vestergaard P. n-3 Fatty acids consumed from fish and risk of atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Clin Nutr* 2005;81(1):50-4.
9. Calo L, Bianconi L, Colivicchi F, et al. N-3 fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1723-8.
10. Biscione F, Totteri A, De Vita A, Lo Bianco F, Altamura G. Effect of omega-3 fatty acids on the prevention of atrial arrhythmias. *Ital Heart J* 2005;6(1):53-9.
11. Honen BN, Saint DA. Polyunsaturated dietary fats change the properties of calcium sparks in adult rat atrial myocytes. *J Nutr Biochem* 2002;13(6):322-29.
12. Jahangiri A, Leifert WR, Patten GS, McMurchie EJ. Termination of asynchronous contractile activity in rat atrial myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem* 2000;206(1-2):33-41.

13. Ninio DM, Murphy KJ, Howe PR, Saint DA. Dietary fish oil protects against stretch-induced vulnerability to atrial fibrillation in a rabbit model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;16(11):1189-94.
14. Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens* 2002;20(8):1493-9.
15. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000;71:343S-8S.
16. Grimsgaard S, Bonna KH, Hansen JB, Myhre ES. Effects of highly purified EPA and DHA on hemodynamics in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;68:52-9.
17. Lopez D, Orta X, Casos K, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after ingestion of fish oil-rich diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(2):H567-72.
18. Rubart M, Zipes DP. NO hope for patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2002;106(22):2764-6.
19. van der Velden HM, Jongsma HJ. Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovasc Res* 2002;(54)2:270-9.
20. Wetzel U, Boldt A, Lauschke J, et al. Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies. *Heart* 2005;91(2):166-70.
21. Dupont E, Ko Y, Rothery S, Coppens SR, Baghai M, Haw M, Severs NJ. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103(6):842-9.
22. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002;54:361-79.
23. Sakabe M, Fujiki A, Nishida K, et al. Enalapril prevents perpetuation of atrial fibrillation by suppressing atrial fibrosis and over-expression of connexin43 in a canine model of atrial pacing-induced left ventricular dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(6):851-9.
24. Severs NJ, Coppens SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 2004;62:368-77.
25. Goldberger AL, Pavelec RS. Vagally-mediated atrial fibrillation in dogs: conversion with bretylium tosylate. *Int J Cardiol* 1986;13:47-55.

26. Wang Z, Pagé P, Nattel S. Mechanism of fleicanide's antiarrhythmic action in experimental atrial fibrillation. *Circ Res* 1992;71:271-87.
27. Hayashi H, Fujiki A, Tani M, Usui M, Inoue H. Different effects of class Ic and III antiarrhythmic drugs on vagotonic atrial fibrillation in the canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31(1):101-7.
28. Nagasawa H, Fujiki A, Fujikura N, Matsuda T, Yamashita T, Inoue H. Effects of a novel class III antiarrhythmic agent, NIP-142, on canine atrial fibrillation and flutter. *Circ J* 2002;66:185-91.
29. Josephson ME. Clinical cardiac electrophysiology. Techniques and interpretations. Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001, page 32-65.
30. Fedorov VV, Sharifov OF, Beloshapko GG, Yushmanova AV, Rosenshtraukh LV. Effects of a new class III antiarrhythmic drug nibentan in a canine model of vagally mediated atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(1):77-89.
31. Wirth KJ, Knobloch K. Differential effects of dofetilide, amiodarone, and class Ic drugs on left and right atrial refractoriness and left atrial vulnerability in pigs. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:166-74.
32. Daleau P, Boudriau S, Michaud M, Jolicoeur C, Kingma JG, Jr. Preconditioning in the absence or presence of sustained ischemia modulates myocardial Cx43 protein levels and gap junction distribution. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79(5):371-8.
33. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37(8):911-7.
34. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964;5:600-8.
35. Harris WS, Sands SA, Windsor SL et al. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 2004;110(12):1645-9.
36. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. AHA Scientific Statement: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106(21):2747-57.
37. Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, et al. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 2002;346(15):113-8.
38. Xiao YF, Kang JX, Morgan JP, Leaf A. Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11000-4.

39. Geelen A, Brouwer IA, Zock PL, et al. N-3 fatty acids do not affect electrocardiographic characteristics of healthy men and women. *J Nutr* 2002;132(10):3051-4.
40. Elvan A, Huang XD, Pressler ML, Zipes DP. Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs. *Circulation* 1997;96(5):1675-85.
41. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, et al. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(3):883-91.
42. van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, et al. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9(6):596-607.
43. Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, et al. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation* 1998;97(7):686-91.
44. Betsuyaku T, Kanno S, Lerner DL, et al. Spontaneous and inducible ventricular arrhythmias after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Pathol* 2004;13(3):156-64.
45. Laird DW, Castillo M, Kasprzak L. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol* 1995;131(5):1193-203.
46. Moreno AP, Saez JC, Fishman GI, Spray DC. Human connexin43 gap junction channels. Regulation of unitary conductances by phosphorylation. *Circ Res* 1994;74(6):1050-7.
47. Darrow BJ, Fast VG, Kleber AG, Beyer EC, Saffitz JE. Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 1996;79(2):174-83.
48. Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL. Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(8):2131-45.
49. Duthe F, Dupont E, Verrecchia F, et al. Dephosphorylation agents depress gap junctional communication between rat cardiac cells without modifying the Connexin43 phosphorylation degree. *Gen Physiol Biophys* 2000;19(4):441-9.

50. Kleber AG. Discontinuous propagation of the cardiac impulse and arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10(7):1025-7.
51. Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2002;105:2753-9.
52. Allessie MA, Boyden PA, Camm J, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103:769-77.
53. Ton MN, Chang C, Carpentier YA, Deckelbaum RJ. In vivo and in vitro properties of an intravenous lipid emulsion containing only medium chain and fish oil triglycerides. *Clin Nutr* 2005;24(4):492-501.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1. Induction of atrial fibrillation (AF) by the extra stimulus technique. A short train of 8 paced atrial beats, followed by two premature atrial complexes, converted sinus rhythm into AF.
- Figure 2. N-3 PUFAs plasma levels. Oral treatment with increased plasma levels of DHA, EPA and total n-3 PUFAs ($p < 0.001$).
- Figure 3. **A.** AF induction by 1 premature atrial complex (PAC). Sustained AF was reduced from 26.0% to 4.2% with the extra stimulus technique by 1 PAC in the oral treatment group ($p = 0.015$). **B.** AF induction by 2 PACs. Sustained AF was reduced from 38.0% to 12.5% with the extra stimulus technique by 2 PACs in the oral treatment group ($p = 0.010$). **C.** AF induction by 3 PACs. Sustained AF was reduced from 48.9% to 10.5% with the extra stimulus technique by 3 PACs in the oral treatment group ($p = 0.001$) and to 28.6% in the IV group ($p < 0.001$).
- Figure 4. AF induction by the burst pacing technique. Sustained AF was reduced from 38.8% to 22.5% with the burst technique in the oral treatment group ($p = 0.034$).
- Figure 5. Representative Western blots for Cx40 (**A**) and Cx43 (**B**) proteins in atrial tissues from controls and n-3 PUFA oral treatment dogs. All protein expression levels were tested in duplicate for each dog. **C** and **D**, mean \pm SEM expression levels for Cx40 and Cx43 ($n = 8$ for controls and $n = 7$ for n-3 PUFA oral treatment dogs). * $p < 0.05$.

TABLES

Table 1. Hemodynamic and electrocardiographic parameters at baseline and during vagal stimulation.

	Controls		PO		IV	
	Baseline	Vagal	Baseline	Vagal	Baseline	Vagal
Blood Pressure						
• Systolic (mmHg)	108 ± 28	84 ± 20*	102 ± 27	85 ± 23†	76 ± 15‡	66 ± 11¶
• Diastolic (mmHg)	85 ± 24	51 ± 17*	84 ± 26	58 ± 20†	48 ± 13‡	37 ± 9¶
End-Diastolic Pressure (mmHg)	10 ± 9		9 ± 6			
ECG						
• Heart Rate (bpm)	128 ± 13	70 ± 8*	119 ± 16	64 ± 11†	146 ± 25	71 ± 7¶
• RR (ms)	474 ± 49	870 ± 96*	512 ± 68	960 ± 156†	422 ± 72	850 ± 85¶
• PR (ms)	104 ± 11	150 ± 24*	115 ± 18	169 ± 34†	91 ± 8‡	126 ± 18¶
• QRS (ms)	55 ± 8	56 ± 10	58 ± 9	55 ± 11	59 ± 9	66 ± 11¶
• QTc (ms)	348 ± 33	317 ± 37*	339 ± 28	296 ± 22†	371 ± 22‡	324 ± 29¶

* p<0.020 between Controls Baseline and Controls Vagal. † p<0.007 between PO Baseline and PO Vagal. ‡ p<0.035 between Controls Baseline and IV Baseline.

¶ p<0.025 between IV Baseline and IV Vagal.

Table 2. Atrial effective refractory periods

ERP	Controls		PO		IV	
	Baseline	Vagal	Baseline	Vagal	Baseline	Vagal
BCL (ms)						
400	133 ± 19	81 ± 20*	128 ± 12	84 ± 21†	145 ± 15	79 ± 20‡
300	122 ± 20	78 ± 21*	115 ± 10	82 ± 18†	124 ± 18	77 ± 18‡
250	113 ± 19	78 ± 23*	106 ± 10	80 ± 17†	114 ± 20	78 ± 16‡
200	105 ± 16	75 ± 27*	102 ± 11	78 ± 17†	109 ± 22	78 ± 17‡

ERP, effective refractory period. BCL, basic cycle length. * p<0.001 between Controls Baseline and Controls Vagal. † p<0.002 between PO Baseline and PO Vagal.

‡ p<0.009 between IV Baseline and IV Vagal.

FIGURES

Figure 1

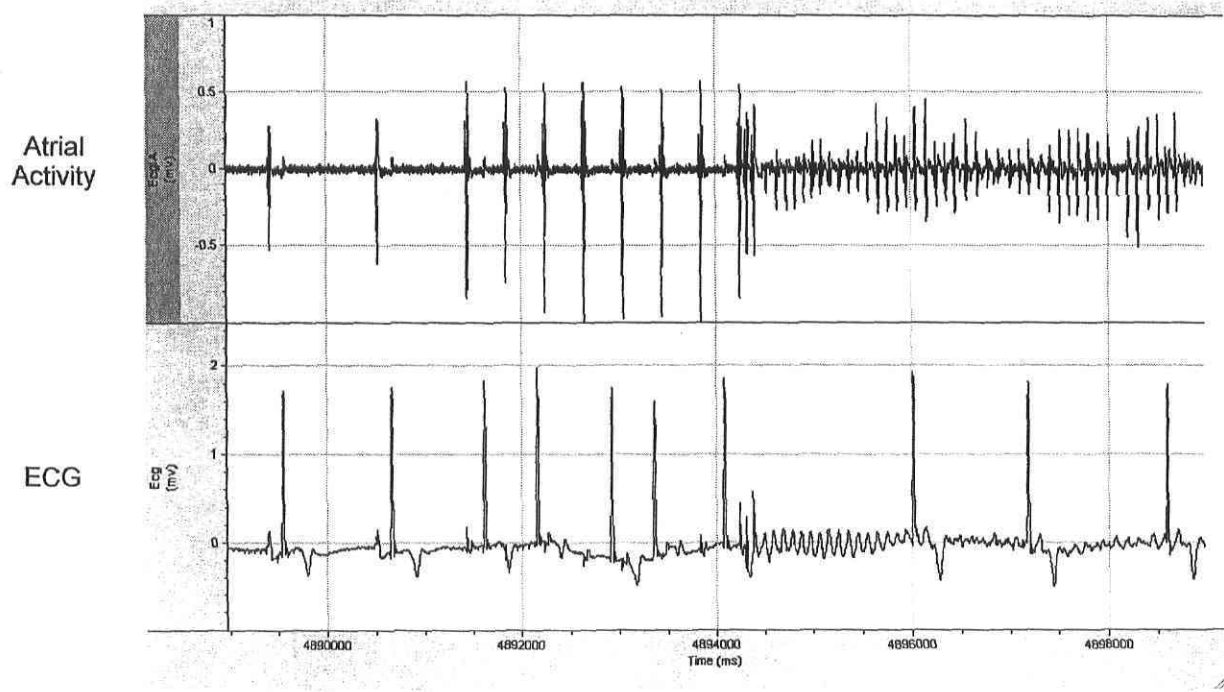


Figure 2

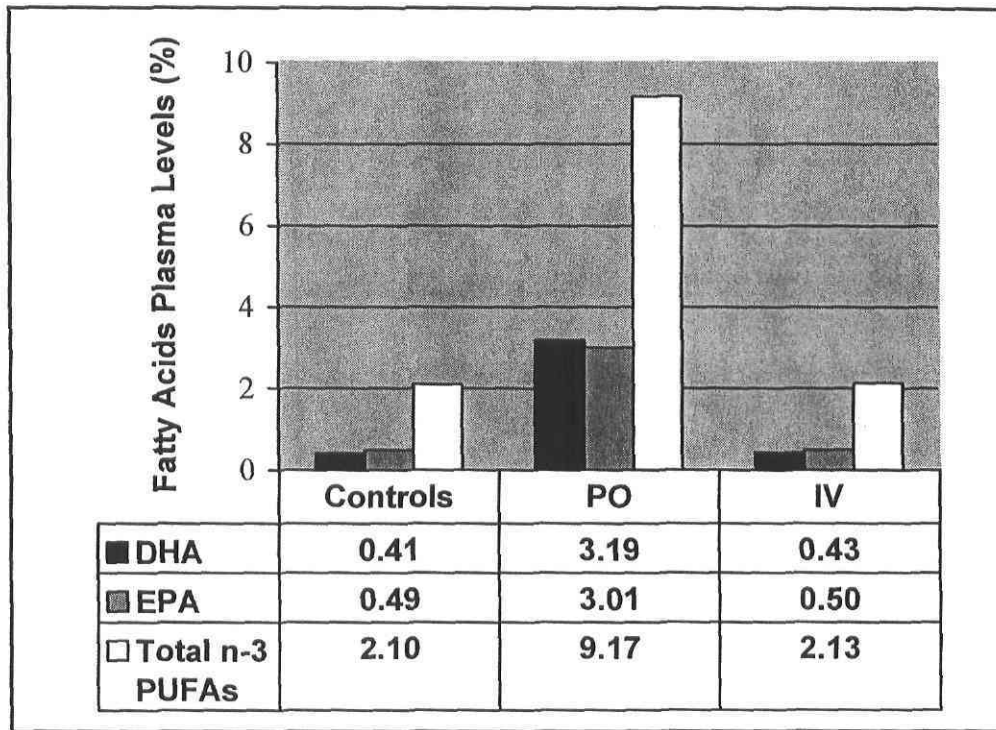


Figure 3A

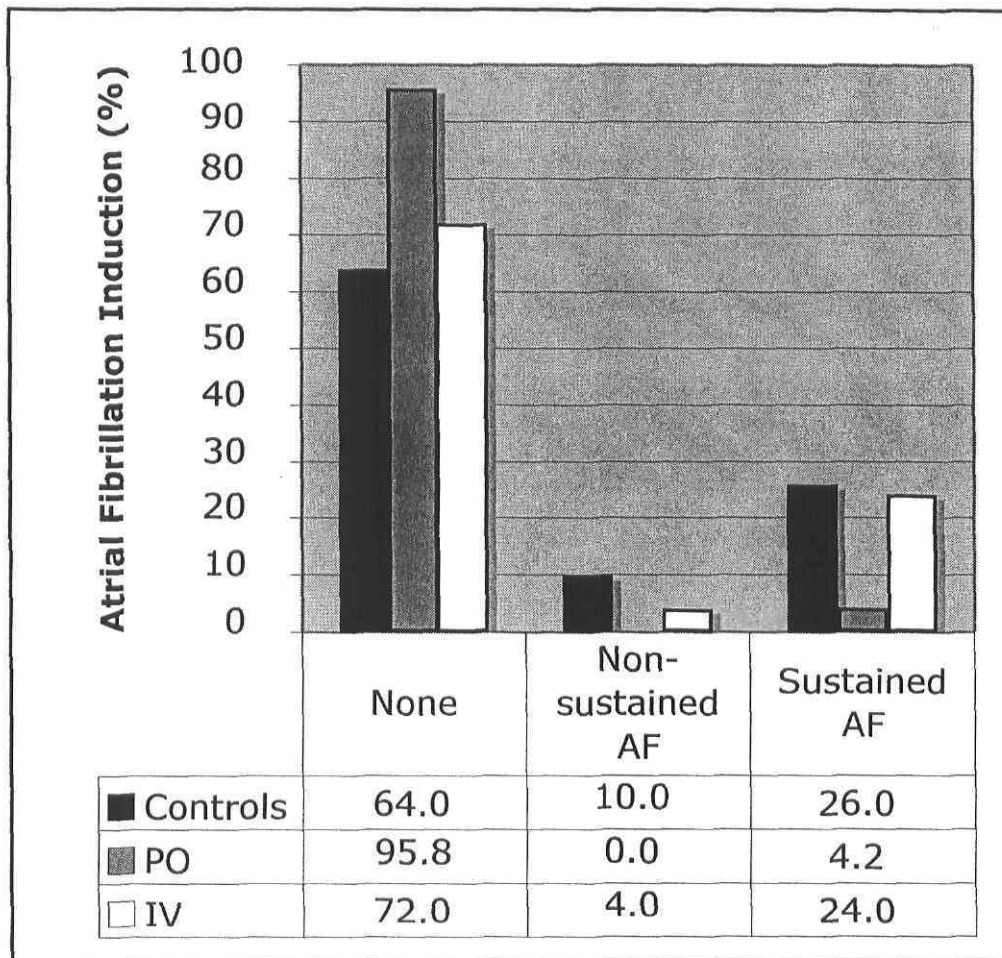


Figure 3B

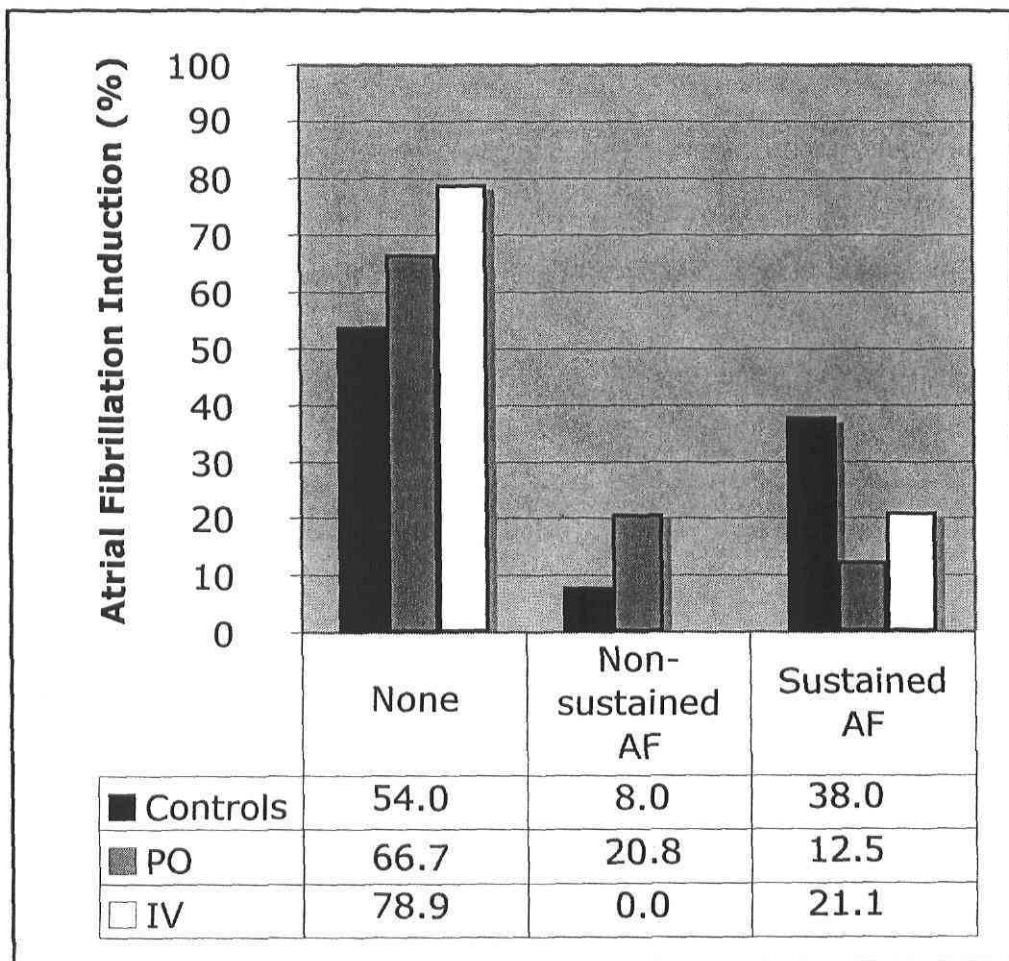


Figure 3C

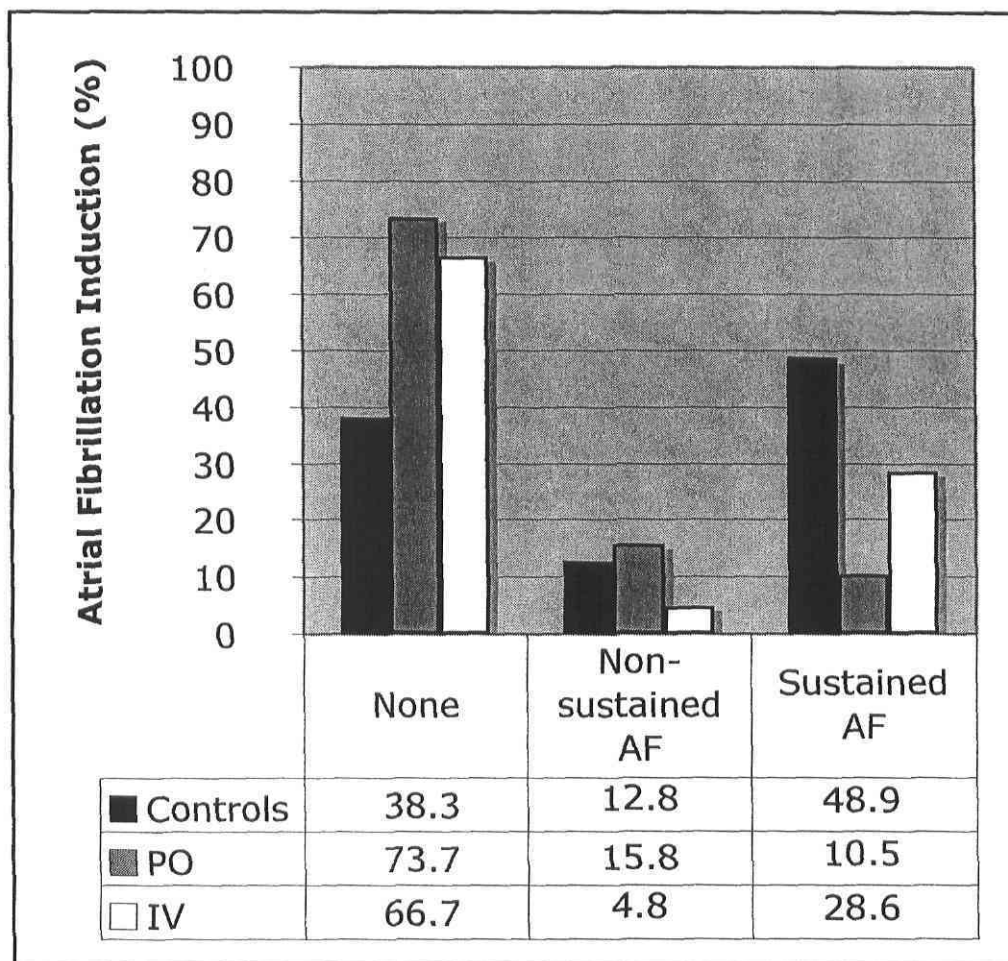


Figure 4

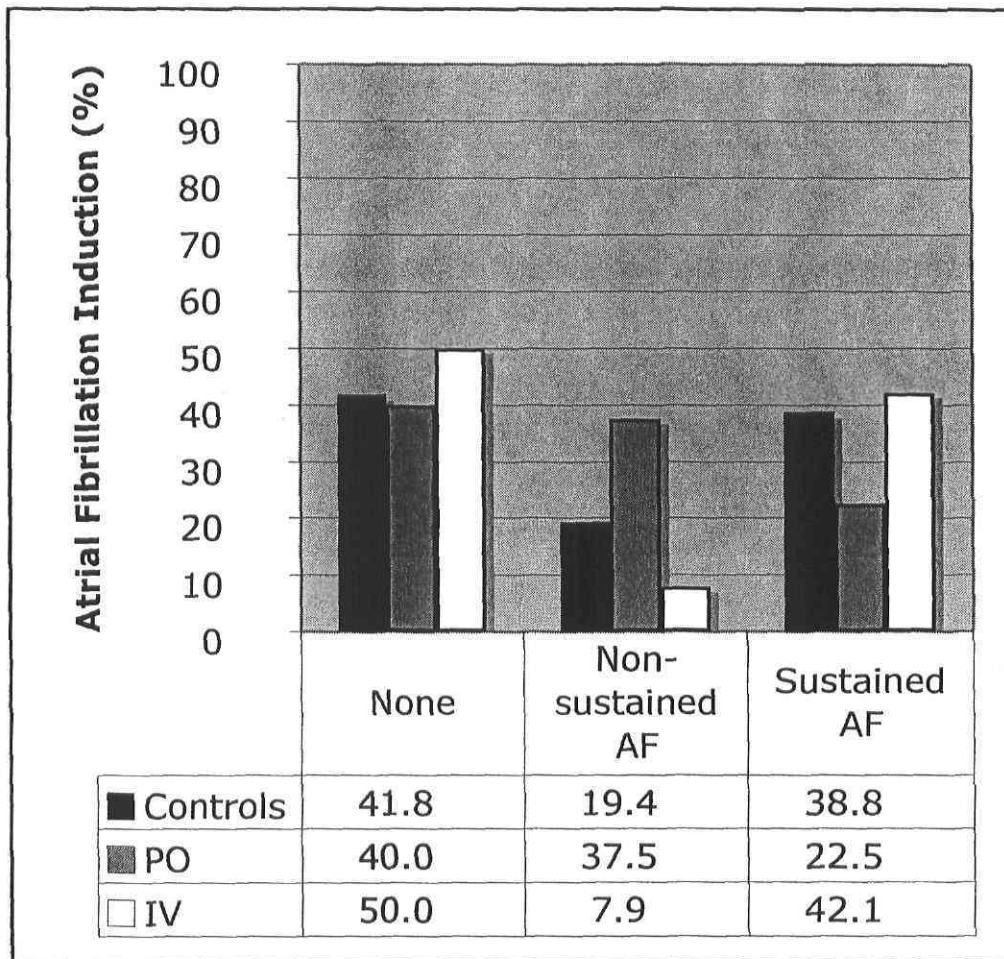
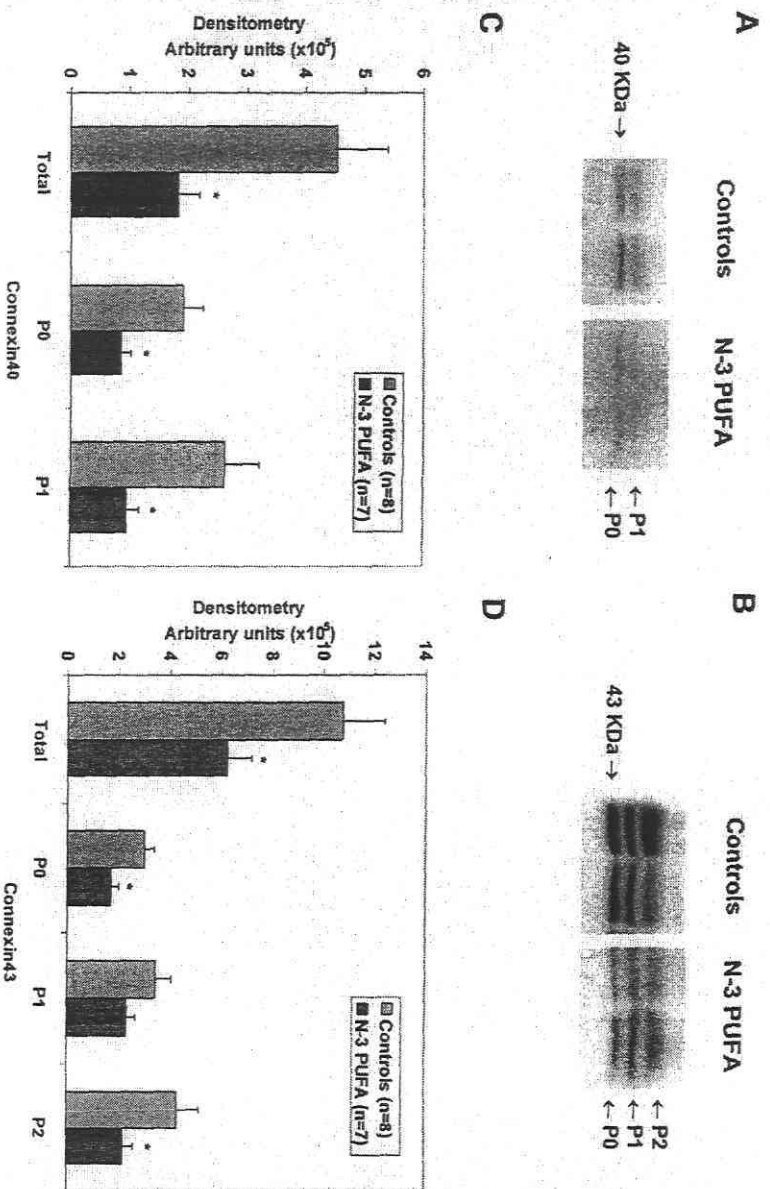
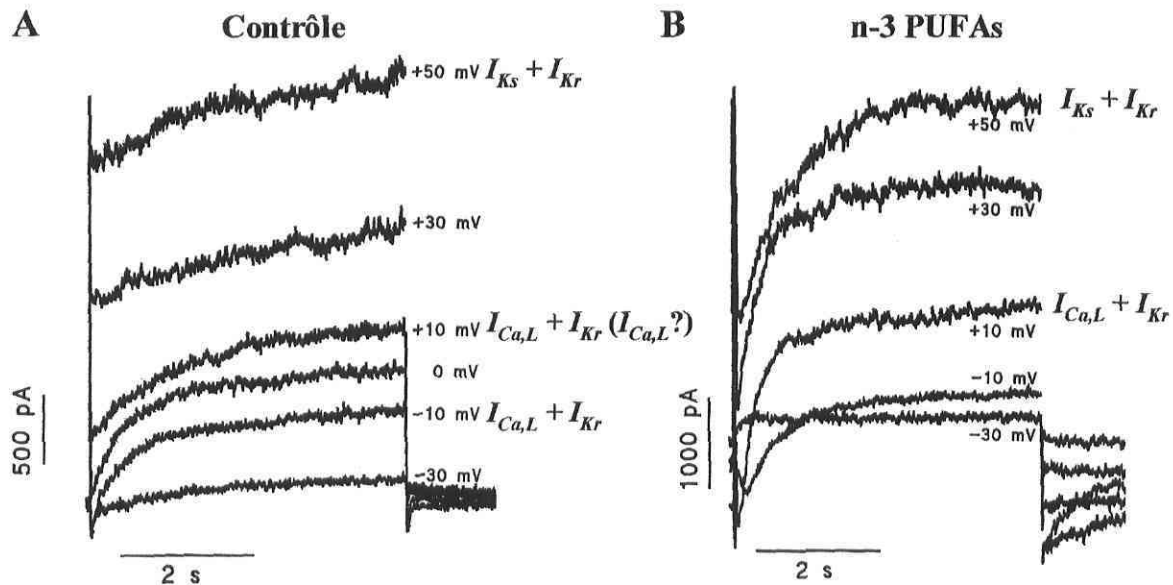


Figure 5



Mesure des courants ioniques par la technique de patch-clamp

L'objectif de l'étude présentée en annexe I était d'évaluer, à l'aide d'un modèle canin d'induction de FA, si l'effet anti-arythmique des n-3 PUFAs observé dans le ventricule était également présent à l'étage auriculaire. Outre les résultats présentés dans le manuscrit, une mesure des courants ioniques exprimés dans les myocytes auriculaires des chiens a également été faite par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. J'ai été en charge d'effectuer cette mesure. La figure suivante illustre les courants ioniques qui ont été détectés.



Enregistrement des courants $I_{Ca,L}$, I_{Kr} et I_{Ks} sur des myocytes auriculaires de chiens avec fibrillation auriculaire. Neuf épisodes de stimulation (-30 à +50 mV, avec incréments de 10 mV) ont été appliqués aux myocytes. La durée de chaque stimulation était de 5 secondes et le potentiel de repos était de -40 mV. A. Chien contrôle. B. Chien ayant reçu un traitement aux n-3 PUFAs par voie orale.

Les résultats démontrent une plus grande densité du courant $I_{Ca,L}$ chez les chiens traités aux n-3 PUFAs comparativement aux chiens contrôles. Le courant $I_{Ca,L}$ est un courant entrant rapide (pic orienté vers le bas), qui est observé dans les 200 premières millisecondes de la stimulation. Aucune différence n'a été remarquée au niveau des autres courants ioniques.

Des analyses de patch-clamp ont été faites sur 11 myocytes auriculaires de chiens contrôles et sur 14 qui provenaient de chiens traités aux n-3 PUFAs (voie orale). Les courants I_{Kr} , I_{Ks} et $I_{Ca,L}$ ont été identifiés respectivement dans 73, 91 et 18% des myocytes du groupe contrôle et dans 78, 89 et 56% de ceux provenant des chiens traités. Ceci indique possiblement une meilleure préservation du courant $I_{Ca,L}$ chez les chiens auxquels on a administré des n-3 PUFAs. Cependant, les résultats présentés ici ne sont pas très concluants, car la technique d'isolement des myocytes influence le courant $I_{Ca,L}$, dont l'amplitude diminue souvent au cours de la procédure. Parfois, même, le courant disparaît complètement. Les courants potassiques rectifiants retardés sont eux aussi affectés par la

technique d'isolement utilisée. En effet, une étude effectuée par Yue et al¹ a analysé ces courants dans des myocytes auriculaires de chien isolés selon deux méthodes différentes. La première consistait à isoler l'oreillette droite et à la perfuser avec une solution contenant de la collagénase. Dans la deuxième technique, les auteurs ont d'abord prélevé un morceau de l'oreillette droite et ils ont isolé les myocytes à l'aide d'une incubation dans une solution de collagénase maintenue sous agitation et oxygénation. Cette technique d'isolement, contrairement à la première, ne permettait pas très bien de détecter les courants potassiques rectifiants retardés.¹

- (1) Yue L, Feng J, Li G-R, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol* 1996;270:H2157-H2168.**

